

Université de Montréal

Régulation de l'expression et de la localisation des ARN *TLC1* et TERRA en réponse à différents stress génomiques chez la levure

Par

Maxime Lalonde

Département de biochimie et médecine moléculaire, Faculté de médecine

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de doctorat
en biochimie

15 juin 2020

© Maxime Lalonde, 2020

Université de Montréal

Département de biochimie et médecine moléculaire, Faculté de médecine

Cette thèse intitulée

Régulation de l'expression et de la localisation des ARN *TLC1* et TERRA en réponse à différents stress génomiques chez la levure

Présenté par

Maxime Lalonde

A été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes

Luc DesGroseillers

Président-rapporteur

Pascal Chartrand

Directeur de recherche

Martin Sauvageau

Membre du jury

Zhou Xu

Examineur externe

Résumé

Les télomères forment la structure qui coiffe les extrémités des chromosomes. Ils sont essentiels pour protéger l'intégrité génomique. À cause du problème de fin de réplication, les télomères raccourcissent à chaque division cellulaire, menant à l'arrêt du cycle cellulaire, à la sénescence et à la mort cellulaire. Pour contrevenir au raccourcissement des télomères, les cellules immortalisées et hautement prolifératives, ainsi que la plupart des eucaryotes unicellulaires tels que *Saccharomyces cerevisiae*, expriment la télomérase, un complexe ribonucléoprotéique enzymatique qui rallonge les télomères.

Pour permettre le maintien de la longueur des télomères et assurer l'intégrité du génome, plusieurs régulateurs contrôlent le recrutement et l'activité de la télomérase, s'assurant du ciblage précis de l'activité de la télomérase à ses substrats. Aux télomères, un dérèglement des mécanismes de régulation de la télomérase peut mener au raccourcissement des télomères, à des fusions de chromosomes et au développement d'un potentiel cancéreux. La télomérase peut aussi agir aux cassures d'ADN où son activité se traduit par l'ajout *de novo* d'un télomère et conduit à la perte de matériel génétique, à l'instabilité génomique et possiblement à la mort cellulaire. Son recrutement et son activité y sont donc inhibés. Les mécanismes par lesquels la cellule régule l'activité de la télomérase aux télomères et aux cassures d'ADN restent encore peu connus. De plus, en réponse à certains stress, ces mécanismes peuvent être altérés. Les travaux présentés dans cette thèse ont pour but d'étudier les régulateurs de l'activité de la télomérase et l'impact de certains stress cellulaires sur cette régulation.

Dans la première partie, nous avons étudié la localisation de l'ARN *TLC1*, la sous-unité ARN de la télomérase, à travers le cycle cellulaire chez *S. cerevisiae*. Alors que cet ARN est majoritairement dans le nucléoplasme en G1/S, il démontre une accumulation nucléolaire en phase G2/M du cycle cellulaire. Chez la levure, la réparation des cassures d'ADN se fait majoritairement par recombinaison homologue et est exclue du nucléole. Dans ce contexte,

nous avons formulé l'hypothèse que l'accumulation de l'ARN *TLC1* au nucléole en G2/M constitue un mécanisme par lequel l'ajout *de novo* de télomère est inhibé aux cassures d'ADN.

Nous avons fixé comme buts de caractériser les mécanismes régulant l'accumulation nucléolaire de l'ARN *TLC1* et d'étudier comment la présence de dommage à l'ADN influence cette régulation.

Nous avons pu montrer que la localisation nucléolaire de l'ARN *TLC1* dépend de l'hélicase Pif1, de la protéine de la recombinaison homologue Rad52 et que la présence de dommage à l'ADN et l'absence de Rad52 influence le trafic nucléaire de cet ARN. Dans ces conditions, la protéine de la recombinaison homologue Rad51 permet l'accumulation de Cdc13 aux cassures et favorise l'accumulation de l'ARN *TLC1* au nucléoplasme et aux cassures d'ADN. Cette accumulation est dépendante de la SUMO ligase Siz1 et mène à une augmentation d'ajout *de novo* de télomère aux sites de cassures d'ADN. Pour pouvoir quantifier l'augmentation d'ajout *de novo* de télomère, nous avons développé une nouvelle approche basée sur le séquençage haut-débit de type Illumina pour identifier et quantifier les événements d'ajout *de novo* de télomère sur le génome entier de manière non-biaisée.

Dans la deuxième partie de la thèse, nous avons étudié les mécanismes contrôlant l'expression d'un régulateur de la télomérase nommé TERRA (telomeric repeats containing RNA). TERRA est un long ARN non-codant qui est transcrit à partir des régions sous-télomériques jusqu'aux répétitions télomériques. Chez *S. cerevisiae*, l'expression de TERRA est inhibée au niveau de sa transcription par le complexe SIR et au niveau de sa dégradation par l'exonucléase Rat1. Pourtant, les télomères courts expriment TERRA à des niveaux élevés. Cette augmentation de l'expression de TERRA permet de concentrer et de cibler l'activité de la télomérase aux télomères courts. En étudiant l'expression de TERRA, nous avons remarqué que les télomères exprimant cet ARN démontrent une perte prématurée de leur cohésion en phase S du cycle cellulaire. Nous pensons que l'organisation structurelle des télomères et, plus particulièrement, la cohésion télomérique participe à la régulation de l'expression de TERRA. De plus, plusieurs groupes ont montré que l'expression de TERRA était régulée en réponse à plusieurs stress, de façon indépendante de la taille des télomères. Dans ce contexte, nous formulons l'hypothèse que le stress oxydatif et les changements métaboliques induits durant la

transition diauxique influence l'expression de TERRA. Pour cette partie de la thèse, nous avons comme but d'étudier comment l'expression de TERRA étaient régulé par les changements métaboliques comme la transition diauxique et d'étudier le rôle joué par le complexe de la cohésine dans la régulation de l'expression de TERRA.

Nous avons montré que les télomères courts montrent une perte de cohésion prématurée en début de phase S, ce qui favorise l'expression de TERRA en *cis*. Alors qu'une perte de fonction partielle de la cohésine résulte en une augmentation de l'expression de TERRA, la rétention forcée de cohésine à un télomère court réprime sa transcription. Cette perte de cohésion aux télomères courts est dépendante de Sir4 mais indépendante de Sir2, ce qui suggère que le rôle de Sir4 dans l'ancrage des télomères à la membrane nucléaire pourrait être impliqué dans ce phénomène. Nous avons également montré que la transcription de TERRA est induite durant la transition diauxique, une phase de croissance cellulaire où, suite à la déplétion du glucose, les cellules adaptent leur métabolisme en faveur de la respiration oxydative. Cette augmentation d'expression coïncide avec l'accumulation cytoplasmique de TERRA.

Ensemble, les travaux présentés dans cette thèse explorent les liens entre les stress cellulaires tels que les dommages à l'ADN, le raccourcissement télomérique, le stress oxydatif et le métabolisme cellulaire, et leur impact sur le trafic de la télomérase et l'expression de son régulateur TERRA.

Mots-clés : *Saccharomyce cerevisiae*, télomérase, ARN *TLC1*, TERRA, télomère, cohésion, dommage à l'ADN, transition diauxique, long ARN non-codant, localisation de l'ARN.

Abstract

Telomeres constitute the structure at the end of linear chromosomes which is essential to protect genome integrity. Due to the end-replication problem, telomeres get shorter with every cell division, leading to cell cycle arrest, senescence and cell death. To counteract telomere shortening, highly proliferative cells and most unicellular eukaryotes, like *Saccharomyces cerevisiae*, express telomerase, a ribonucleoprotein enzyme that elongates telomeres.

Many regulatory pathways affect telomerase activity and recruitment to assure precise targeting of telomerase activity to its proper substrate, the telomeres. Impairing these pathways can lead to telomere shortening, end-to-end chromosome fusions and immortalization. Telomerase can also be recruited at double strand breaks (DSBs), where its activity leads to *de novo* telomere additions which induce genomic instability, loss of genetic information and possibly cell death. For this reason, telomerase recruitment and activity is strongly inhibited at DSB. However, the mechanisms behind this regulation are still poorly understood. Furthermore, many cellular stresses affect telomerase regulation at telomeres and DSBs. Our goal is to study the regulation of telomerase activity and the impact of cellular stresses on this regulation.

In the first part of this thesis, we looked at the cell cycle localization of the *Saccharomyces cerevisiae* RNA subunit of the telomerase, *TLC1* RNA. While *TLC1* RNA is mostly in the nucleoplasm in G1/S, it accumulates in the nucleolus in G2/M. In yeast, the most common DSB repair pathway is homologous recombination (HR). As HR is mostly excluded from the nucleolus in G2/M, we propose that the accumulation of *TLC1* RNA in the nucleolus in G2/M may represent a regulatory pathway that repress *de novo* telomere addition by physically separating telomerase from sites of DNA repair by HR. We aim to characterize the mechanisms by which *TLC1* RNA localization is regulated and how the presence of DSB affects this trafficking.

We were able to show that the nucleolar localization of *TLC1* RNA is dependent on the Pif1 helicase and on the HR protein Rad52. Furthermore, we showed that the presence of DSBs and the absence of Rad52 alter the nuclear trafficking of *TLC1* RNA. In these conditions, Rad51 favors the accumulation of Cdc13 at DSBs and promotes the nucleoplasmic accumulation of *TLC1* RNA. This accumulation is dependent on the SUMO ligase Siz1 and leads to an increased addition of *de novo* telomere at DNA breaks. In order to identify *de novo* telomere addition events genome-wide, we developed an unbiased genome-wide technique based on Illumina sequencing of genomic DNA.

In the second part of this thesis, we studied another regulator of telomerase activity, the long non-coding RNA (lncRNA) TERRA (telomeric repeats-containing RNA), which is transcribed from subtelomeric regions through the telomeric tracts. In *S. cerevisiae*, TERRA expression is controlled at the transcriptional level by the SIR complex and its degradation by the exonuclease Rat1. Nevertheless, short telomeres escape transcriptional inhibition and degradation to express TERRA at higher levels. TERRA serves as a regulator of telomerase, allowing the concentration and the targeting of telomerase activity to short telomeres. While studying TERRA expression, we observed that TERRA-expressing telomeres display a premature S-phase loss of cohesion. We propose that cohesin and telomere cohesion are regulators of TERRA expression. In addition, other groups have shown that TERRA expression was regulated in response to different cellular stress. This regulation seems to be independent from telomere length. In these contexts, we propose that oxidative stress and metabolic changes induced during the diauxic shift affect TERRA expression. We aim to study how the diauxic shift affects TERRA expression and study the role of cohesin in regulating TERRA expression.

We were able to show that telomere cohesion inhibits TERRA expression and that short telomeres display a premature loss of cohesion to allow TERRA expression. This loss of cohesion is dependent on Sir4 and probably on Sir4-mediated telomere anchoring at the nuclear membrane. Additionally, we showed that TERRA transcription is increased during the diauxic shift, when yeast cells switch from fermentative glycolysis to oxidative respiration. Yeast cells in this phase also display a cytoplasmic accumulation of TERRA molecules.

Altogether, the articles presented in this thesis explore the interplay between cellular stresses such as DNA damage, telomere shortening, oxidative stress and respiratory metabolism, and their roles in the regulation of the localisation and expression of *TLC1* RNA and TERRA.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, telomerase, *TLC1* RNA, TERRA, telomere, cohesion, DNA damage, diauxic shift, long non-coding RNA.

Table des matières

[illegible]

1.5.2.3.	La réparation par recombinaison homologue (HR)	32
1.5.3.	La réponse aux dommages à l'ADN.....	38
1.5.3.1.	L'implication de la SUMOylation dans la réponse aux dommages à l'ADN.....	40
1.5.3.2.	Les effecteurs de la réponse aux dommages à l'ADN.....	42
1.6.	La cohésion des chromatides sœurs	43
1.6.1.	La cohésine	44
1.6.2.	L'établissement et la régulation de la cohésion	45
1.6.3.	La cohésine comme régulateur transcriptionnel	49
1.7.	Les réarrangements chromosomiques grossiers (GCRs)	50
1.7.1.	Les méthodes pour étudier l'ajout <i>de novo</i> de télomère	52
1.7.2.	La régulation de l'ajout <i>de novo</i> de télomère	53
1.7.3.	Les sites préférentiels pour l'ajout <i>de novo</i> de télomère	55
1.8.	La modulation du métabolisme cellulaire en réponse au stress comme source de stress génomique	57
1.8.1.	La transition diauxique	58
1.8.2.	La régulation transcriptionnelle du métabolisme énergétique en fonction de la présence de glucose.....	59
1.8.3.	La transition diauxique et les télomères	60
2.	Article 1 –Séparation spatiale de la télomérase aux sites de dommages à l'ADN selon le cycle cellulaire	64
2.1.	Mise en contexte	65
2.2.	Contribution des auteurs	65
2.3.	Texte de l'article.....	66
2.3.1.	Abstract	66
2.3.2.	Introduction.....	66

2.3.3.	Results	69
2.3.3.4.	TLC1 RNA nucleoplasmic accumulation after DNA damage depends on Cdc13 and the MRX complex, and is regulated by the DNA damage response pathway	72
2.3.3.5.	Cdc13 clusters increase after DNA damage and accumulate at DSB sites	74
2.3.3.6.	Temporal analysis of Cdc13 foci formation and TLC1 RNA localization at DNA damage sites.....	75
2.3.3.7.	The E3 SUMO ligase Siz1 regulates the nucleoplasmic accumulation of TLC1 RNA after DNA damage.....	77
2.3.3.8.	Siz1 promotes de novo telomere addition in the absence of RAD52.....	78
2.3.3.9.	Identification of telomere healing events in bleomycin treated cells.....	80
2.3.4.	Discussion	81
2.3.5.	Methods	83
2.3.5.1.	Constructs and strains	83
2.3.5.2.	Cell-cycle dependent localization of <i>TLC1</i> RNA and induction of DSBs.....	83
2.3.5.3.	FISH and IF.....	84
2.3.5.4.	Image acquisition, deconvolution, and processing	85
2.3.5.5.	Live cell Imaging.....	86
2.3.5.6.	Quantitative analysis of Cdc13 foci and clusters	86
2.3.5.7.	DSB resection assay	86
2.3.5.8.	GCR assay and characterization of telomere healing events	87
2.3.5.9.	Identification of telomere healing events by Illumina paired-end sequencing	88
2.3.5.10.	Statistical analysis.....	89
2.3.5.11.	Online supplemental material.....	90
2.3.6.	Acknowledgments.....	90

2.3.7. Footnotes	91
2.3.8. Figures and tables	92
2.3.8. Supplementary materials	105
3. Article 2 – Induction et relocalisation des ARN contenant des répétitions télomériques durant la transition diauxique chez la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	115
3.1. Mise en contexte	116
3.2. Contribution des auteurs	116
3.3. Texte de l'article	117
3.3.1. Abstract	117
3.3.2. Introduction.....	118
3.3.3. Materials and methods	120
3.3.3.1. Yeast strains and growth conditions.....	120
3.3.3.2. Live-cell imaging.....	121
3.3.3.3. RNA-FISH	121
3.3.3.4. RNA extraction and RT-qPCR analyses.....	122
3.3.3.5. RNA half-life measurement	123
3.3.3.6. Telomere length analysis by Southern blot	124
3.3.4. Results	124
3.3.4.1. TERRA expression is induced during diauxic shift in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	124
3.3.4.2. TERRA transcripts are exported to the cytoplasm during diauxic shift	128
3.3.5. Discussion	128
3.3.6. Acknowledgments.....	130
3.3.7. Figures and tables	131

3.3.8. Supplementary materials	140
4. Article 3 – Contrôle de l’expression de TERRA par la cohésion télomérique chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	141
4.1. Mise en contexte	142
4.2. Contribution des auteurs	142
4.3. Texte de l’article	143
4.3.1. Abstract	143
4.3.2. Introduction	143
4.3.3. Results	145
4.3.3.1. TERRA-expressing telomeres display premature loss of cohesion in S phase.....	145
4.3.3.2. Telomere shortening induces loss of telomeric cohesion	146
4.3.3.3. Sir4 plays a role in the length-dependent regulation of telomere cohesion.	148
4.3.3.4. Cohesin acts in cis to inhibit TERRA expression and increase TPE	149
4.3.4. Discussion	150
4.3.5. Experimental procedures	153
4.3.5.1. Yeast strains	153
4.3.5.2. Live-cell imaging	153
4.3.5.3. Telomere shortening experiment	154
4.3.5.4. Chromatin Immunoprecipitation	154
4.3.5.5. RNA Extraction and RT-qPCR Analyses	155
5. Discussion	170
5.1. La régulation en phase G2/M de la télomérase	170
5.2. Pif1 et la restriction de l’accès au substrat	171

5.3. Les protéines de la recombinaison homologue et la régulation de l'ajout <i>de novo</i> de télomère	172
5.4. La SUMOylation et le trafic nucléoplasmique de l'ARN <i>TLC1</i> en réponse aux dommages à l'ADN	177
5.5. L'établissement d'une méthode de séquençage haut débit pour identifier les événements d'ajout <i>de novo</i> de télomère	179
5.6. La régulation de l'expression de TERRA par la cohésine.....	184
5.7. La régulation de la cohésion télomérique.....	185
5.8. L'organisation structurelle télomérique comme régulateur de l'expression de TERRA...	186
5.9. L'induction de TERRA durant la transition diauxique	188
5.10. L'induction de TERRA et la réponse au stress	189
5.11. Les rôles de TERRA dans la réponse au stress.....	191
5.12. La localisation de TERRA au cytoplasme	192
6. Conclusion	193
7. Références bibliographiques.....	197
Annexe 1 – Smc5/6 est un complexe associé aux télomères et régule la liaison de Sir4 au télomère ainsi que l'effet de position télomérique (TPE).....	245
Annexe 2 – Imagerie de l'ARN de la télomérase chez la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i> et en cellules humaines par hybridation fluorescente <i>in situ</i>	268
Annexe 3 – TERRA, un régulateur à plusieurs facettes de l'activité de la télomérase aux télomères	285

Liste des tableaux

Table S1. –	Yeast strains used in this study	113
Table S2. –	Statistical analysis of Fig. 4 B (nucleoplasmic localization of TLC1 RNA)	114
Table S3. –	List of all de novo telomere additions found with the Illumina sequencing approach	114
Table 1. –	Yeast strains used in this study	131
Table 2. –	Half-life of TERRA in log phase and diauxic shift ($N \geq 3$)	134
Table S4. –	Yeast strains used in this study	162

Liste des figures

Figure 1. –	Structure du télosome.	3
Figure 2. –	Le problème de fin de réplication.	8
Figure 3. –	Structure de la télomérase.....	9
Figure 4. –	Régulation du recrutement de la télomérase aux télomères.....	15
Figure 5. –	La transcription de TERRA aux télomères courts induit la formation de T-Recs....	25
Figure 6. –	Principales étapes des voies de réparation par ligation des extrémités non-homologues (NHEJ).	31
Figure 7. –	Principales étapes des voies de réparation par recombinaison.	36
Figure 8. –	Transactions sur l'ADN simple brin entre RPA, Rad51 et Rad52.	38
Figure 9. –	Composition de la cohésine.	45
Figure 10. –	L'établissement de la cohésion.	48
Figure 11. –	Voies influençant la génération de réarrangements chromosomiques grossiers (GCR).	51
Figure 12. –	Schématisation de l'essai GCR chez la levure.....	53
Figure 13. –	La transition diauxique.	58
Figure 14. –	Intranuclear trafficking of <i>TLC1</i> RNA during the cell cycle depends on Pif1.	93
Figure 15. –	<i>TLC1</i> RNA accumulates in the nucleoplasm in G2/M in <i>rad52Δ</i> cells after DNA damage.	95
Figure 16. –	<i>TLC1</i> RNA partially colocalizes with DSB sites in <i>rad52Δ</i> cells.....	96
Figure 17. –	Genetic requirements for nucleoplasmic accumulation of <i>TLC1</i> RNA after DNA damage in <i>rad52Δ</i> cells.	97
Figure 18. –	Cdc13 accumulates at sites of DNA break in <i>rad52Δ</i> , but not in <i>rad51Δ</i> cells....	99
Figure 19. –	Kinetics of accumulation of Cdc13 and <i>TLC1</i> RNA at sites of DNA damage in <i>rad52Δ</i> cells.	100
Figure 20. –	The E3 SUMO ligase Siz1 is required for the accumulation of <i>TLC1</i> RNA in the nucleoplasm of <i>rad52Δ</i> cells after DNA damage.	101
Figure 21. –	Siz1 promotes de novo telomere addition in <i>rad52Δ</i> cells.	102

Figure 22. –	Identification of telomere healing events in bleomycin-treated cells.	103
Figure 23. –	Model for telomerase trafficking in G2/M and at DNA damage sites.	104
Figure S1. –	<i>TLC1</i> RNA localization in <i>pif1Δ</i> and <i>pif1-m2</i> strains.....	105
Figure S2. –	Validation of bleomycin and nocodazole treatments of yeast cells.	106
Figure S3. –	Analysis of <i>TLC1</i> RNA colocalization with double-strand breaks.	108
Figure S4. –	Quantitative analysis of Cdc13 foci and clusters after induction of DNA damage. 110	
Figure S5. –	Siz1 is not involved in the resection of DSBs.	112
Figure 24. –	Accumulation of TERRA during diauxic shift in yeast.	132
Figure 25. –	TERRA expression is upregulated during diauxic shift.	133
Figure 26. –	Telomere length is maintained during diauxic shift.	135
Figure 27. –	Telomere position effect is maintained during diauxic shift.....	137
Figure 28. –	Accumulation of TERRA in the cytoplasm of cells in diauxic shift.....	138
Figure 29. –	FISH detects TERRA induction and accumulation in the cytoplasm during diauxic shift.	139
Figure S6. –	Validation of diauxic shift induction using specific gene markers.	140
Figure S7. –	Expression of TERRA and subtelomeric genes during glucose starvation.	140
Figure 30. –	TERRA-expressing telomeres display impaired cohesion.....	157
Figure 31. –	Short telomere display cohesion defects while maintaining a constant amount of Mcd1 bound at the telomere.....	158
Figure 32. –	Telomere loss of cohesion is dependent on telomere length and on Sir4.	159
Figure 33. –	Cohesin regulates TERRA expression and telomere proximal transcription.....	160
Figure 34. –	Model for the telomere length regulation of TERRA expression by telomeric cohesion.	161
Figure S8.	Southern blot validation of proper integration of the TetO and the telomere shortening system.	166
Figure S9.	Time-lapse confocal imaging of an S phase cell showing transient telomere 6R doublet.	168

Figure S10. Validation of the efficiency of the ChIP and the tel6R inducible shortening system.

.....169

Figure 35. – Effet de la taille de la séquence TG au site de cassure et de la présence de Rad52 sur l'ajout *de novo* de télomère à un site de cassure induite par l'endonucléase HO....177

Figure 36. – Analyse de l'emplacement des sites d'ajout *de novo* de télomère détectés par séquençage Illumina de l'ADN génomique.183

Liste des sigles et abréviations

5-FOA : acide 5-fluoroorotique (5-fluoro-orotic acid)

8-oxoG : 8-oxo-guanine

ADN : acide désoxyribonucléique

Alt-NHEJ : réparation par ligation des extrémités non-homologues alternative (alternative non homologous end-joining)

AP : apurique/apyrimidique

APC : complexe promoteur de l'anaphase (anaphase promoting complex)

ARN : acide ribonucléique

ARNnc : ARN non-codant

ARS : origine de réplication autonome (autonomous replication site)

BER : réparation par excision de base (base excision repair)

BIR : réparation par la réplication induite par les cassures (break induced replication)

cAMP : adénosine monophosphate cyclique

CDK : kinase dépendante des cyclines (cycline dependant kinase)

ChIP : immunoprécipitation de la chromatine (chromatin immunoprecipitation)

c-NHEJ : réparation par ligation des extrémités non homologues classique (classical non homologous end-joining)

DDR : réponse aux dommages à l'ADN (DNA damage response)

DSB : cassure d'ADN double brin (double strand break)

ESR : réponse au stress environnemental (environmental stress response)

FISH: hybridation fluorescente *in situ* (fluorescent *in situ* hybridization)

GCR : réarrangement chromosomique grossier (gross chromosomal rearrangement)

GFP : protéine verte fluorescente (green fluorescent protein)

GG-NER : voie globale du génome du NER (global genome NER)

H3K79me : histone H3 méthylée sur la lysine 79

H4K16ac : histone H4 acétylée sur la lysine 16

HR : réparation par recombinaison homologue (homologous recombination)

hTERT : rétrotranscriptase de la télomérase chez l'humain (human telomerase reverse transcriptase)

hTR : ARN de la télomérase chez l'humain (human telomerase RNA component)

HU : hydroxyurée (hydroxyurea)

IF : immunofluorescence

kb : kilobases

lncRNA : ARN long non-codant (long non-coding RNA)

MGMT : O⁶-méthylguanine ADN méthyltransférase

MMEJ : réparation par jonction des extrémités médiée par micro homologie (microhomology mediated end joining)

MMR : réparation des mésappariement (mismatch repair)

MMS : méthanesulfonate de méthyle (methyl methanesulfonate)

NER : réparation par excision de nucléotides (nucleotide excision repair)

NHEJ : ligation des extrémités d'ADN non homologues (non-homologous end joining)

ORF : cadre de lecture ouvert (open reading frame)

PAR : région pseudo-autosomique (pseudo autosomal region)

pb : paire de bases

PCR : réaction de polymérisation en chaîne (polymerase chain reaction)

PKA : protéine kinase A

PTM : modification post-traductionnelle (post-translational modification)

R-loops : boucle R

RFC : facteur de replication alternatif C (alternative replication factor C)

ROS : espèces réactives de l'oxygène (reactive oxygen species)

RT-qPCR : transcription inverse suivi de PCR quantitatif (quantitative reverse transcriptase PCR)

SDSA : réparation par l'hybridation des brins de façon dépendante de la synthèse (synthesis-dependent strand annealing)

SMC : complexe de maintenance structurelle (structural maintenance complex)

SSA : réparation par hybridation simple brin (single strand annealing)

SSB : cassure d'ADN simple brin (single strand break)

SPB : pôle du fuseau mitotique (spindle pole body)

STR : répétitions sous-télomériques (subtelomeric repeated elements)

STUbl : ubiquitine ligase ciblant les modifications SUMO (SUMO-targeted ubiquitin ligase)

TAD : domaine associé de façon topologique (topologically associated domain)

TC-NER: voie couplée à la transcription du NER (transcription coupled NER)

tDDRNA : ARN télomérique induite en réponse aux dommages à l'ADN (telomeric DNA damage response ARN)

TERRA : ARN contenant des répétitions télomériques (telomeric repeats containing RNA)

TMG : guanosine tri-méthylée (trimethylguanosine)

TPE : effet de position télomérique (telomere position effect)

TSS : site de départ de la transcription (transcription start site)

UBL : modification semblable à l'ubiquitine (ubiquitine-like modification)

UTR : région non traduite (untranslated region)

UV : ultraviolet

γ H2AX : variant d'histone H2Ax phosphorylé

Remerciements

Je tiens tout d’abord à remercier mon directeur de recherche, Pascal Chartrand. Merci de m’avoir accepté dans ton laboratoire pour un stage de Baccalauréat qui s’est transformé en Maîtrise puis en Doctorat. Merci de m’avoir formé en tant que scientifique et de m’avoir guidé et accompagné durant cette épopée qui représente, au moment de l’écriture de ces lignes, le quart de ma vie.

Merci à tous les membres, présents et passés, de mon laboratoire pour les discussions, le temps partagé et les nombreux TGIF. Je tiens à remercier particulièrement Karen Shahbaban et Emilio Cusanelli qui m’ont aussi servi de mentor et d’exemples. Merci à Karen également pour les 5@7, le temps perdu et le support. Merci à Hadrien Laprade d’avoir souffert à mes côtés et d’être devenu un ami.

Merci aux amis que je me suis fait à l’université de Montréal. Je ne peux nommer tout le monde mais merci pour votre amitié à Charline, Aurelien, Camille, Mathieu, Fadi, Emmanuelle, Lian, Samuel, Flore, Pierre, Alix. Je suis une meilleure personne, et légèrement plus alcoolique, dû au fait de vous avoir connus.

Merci aux membres de mon comité de thèse, Dr. Daniel Zenklusen et Dr. Stephen Michnick, pour votre encadrement ainsi qu’aux membres de mon jury de thèse qui auront la pénible tâche de parcourir ce long document qui rassemble les travaux effectués durant 8 longues années, Dr. Luc DesGroseillers, Dr. Martin Sauvageau, Dr. Zhou Xu, et Dr. Jean-Claude Labbé.

Merci à ma famille, vous avez toujours cru en moi et m’avez toujours encouragé et soutenu à travers ce long parcours. Vous avez été un roc sur lequel j’ai pu me reposer et chercher le réconfort quand j’en avais besoin.

Merci à mes amis qui me connaissent depuis toujours pour votre soutien et vos encouragements. Sans vous, je n’y serais jamais arrivé. Votre amitié a été importante pour

m'aider à survivre à cette étape de ma vie. Merci à Etienne, Claudia, Daniel, Will et Carl de m'avoir servi d'échappatoire, de m'avoir toujours rappelé qui j'étais et de m'avoir montré comment devenir plus que moi-même.

Un gros merci à Irène, le rôle que tu as joué dans ma vie dans cette dernière année ne peut être ignoré. Tu as su donner un sens à toute cette épopée. J'ai hâte de passer à la prochaine étape de ma vie à tes côtés.

Finalement un gros merci à moi-même, j'ai quand même fait un boulot pas si pire.

1. Introduction

Cette thèse présente les projets auxquels j'ai contribué durant mon doctorat. Ils ont comme point commun les ARN non-codants impliqués dans la régulation des télomères : l'ARN de la télomérase et l'ARN TERRA, issu de la transcription des télomères. Plus spécifiquement, ces projets portent sur l'impact de différents stress génomiques, tels que les cassures d'ADN, le stress oxydatif et métabolique, et le raccourcissement des télomères, sur la régulation de la localisation et/ou expression de ces ARN non-codants. Tous ces projets ont été effectués dans l'organisme modèle *Saccharomyces cerevisiae*. La littérature présentée ici, à moins que spécifié autrement, réfère donc à cette levure.

1.1. Les télomères

Les télomères forment la structure nucléoprotéique protégeant les extrémités des chromosomes linéaires chez la majorité des eucaryotes (1, 2). Ils sont essentiels au maintien de la stabilité du génome. Étant des extrémités d'ADN double brin avec une extension simple brin, ils ont une structure similaire à des cassures d'ADN double brin (DSB). Des processus sont donc nécessaires afin d'identifier et de traiter de façons différentes ces deux types d'extrémités (1, 2). En effet, les extrémités créées par un DSB doivent être détectées et réparées le plus rapidement possible, tandis que les extrémités télomériques doivent être maintenues et ne doivent pas être reconnues comme une cassure par la machinerie de réparation de l'ADN. Un défaut dans cette ségrégation des processus peut amener, d'un côté, à la stabilisation d'un DSB et à la perte d'Information génétique et, de l'autre côté, à la « réparation » des télomères par les mécanismes classiques de ligation des extrémités d'ADN non homologues (NHEJ). Cette réparation erronée crée de l'instabilité génomique et peut mener à des aberrations chromosomiques telles que des fusions entre chromosomes, des réarrangements

chromosomiques, des défauts de ségrégation des chromosomes durant la mitose ainsi qu'induire l'arrêt du cycle cellulaire, la sénescence et la mort cellulaire (3, 4). Pour permettre de protéger les extrémités des chromosomes et empêcher de tels scénarios, plusieurs protéines sont présentes au niveau des télomères et exercent plusieurs fonctions dont la régulation de la réplication, de la localisation, de la réparation, de la transcription des télomères ainsi que du recrutement de la télomérase, enzyme responsable de l'élongation des télomères. Ces protéines et leurs fonctions seront couvertes ci-dessous.

1.1.1. Séquences télomériques et sous-télomériques

Chez la levure, les télomères sont composés d'environ 300pb de répétitions dégénérées TG₍₁₋₃₎ avec une protrusion 3' simple brin d'environ 12-15 nucléotides (1, 5, 6). La longueur de la partie d'ADN simple brin peut cependant atteindre entre 30 et 100nt en fin de phase S. Celle-ci est dépendante de la dégradation du brin 5' et de l'élongation du brin 3' par la télomérase et montre une coordination précise avec la machinerie de réplication (7, 8). Les télomères sont dépourvus de nucléosomes mais cela n'implique pas qu'ils ont une structure désorganisée, les protéines télomériques permettant une organisation structurée appelée télosome (9) (Fig.1A).

La région en amont des répétitions télomériques se nomme le sous-télomère. Ces régions sont hétérogènes en séquence et en taille mais possèdent des séquences et caractéristiques partagées entre elles. Deux éléments servent à catégoriser les sous-télomères : la région X et la région Y' (10). La région X est présente dans tous les sous-télomères et est composée d'une séquence centrale d'environ 500pb de longueur et de séquences supplémentaires hétérogènes (10). Bien que la séquence des sous-télomères soit hétérogène, beaucoup de séquences sont partagées entre plusieurs télomères, rendant l'étude de sous-télomères uniques difficile. Aussi, à l'intérieur de cet élément se retrouve parfois des répétitions télomériques dont la séquence diverge entre les sous-télomères. La région Y' fait entre 5 et 7kb de longueur (1). Elle est présente dans environ la moitié des sous-télomères et comporte entre 1 et 4 copies répétées de la même séquence (1). Lorsqu'elle est présente, la région Y' se situe

entre la région X et le télomère. Cette région contient un ORF codant pour une hélicase de fonction inconnue. Les deux régions contiennent aussi des origines de réplication servant à s'assurer de la réplication appropriée des télomères et des sites de liaison pour la protéine Tbf1 qui jouent un rôle dans la répression transcriptionnelle sous-télomérique (1, 11). Les sous-télomères sont pauvres en gènes et ceux-ci sont principalement impliqués dans le métabolisme de carbohydrates, dans la composition de la paroi cellulaire ou sont de fonctions inconnues (12). Bien que les télomères sont dépourvus de nucléosomes, les sous-télomères en possèdent, bien que la densité en nucléosome est plus faible qu'ailleurs (9). Les histones sous-télomériques sont caractérisées par l'absence d'acétylation sur la lysine 16 de l'histone H4 (H4K16ac), typique de régions non-transcrites (13) (Fig.1A).

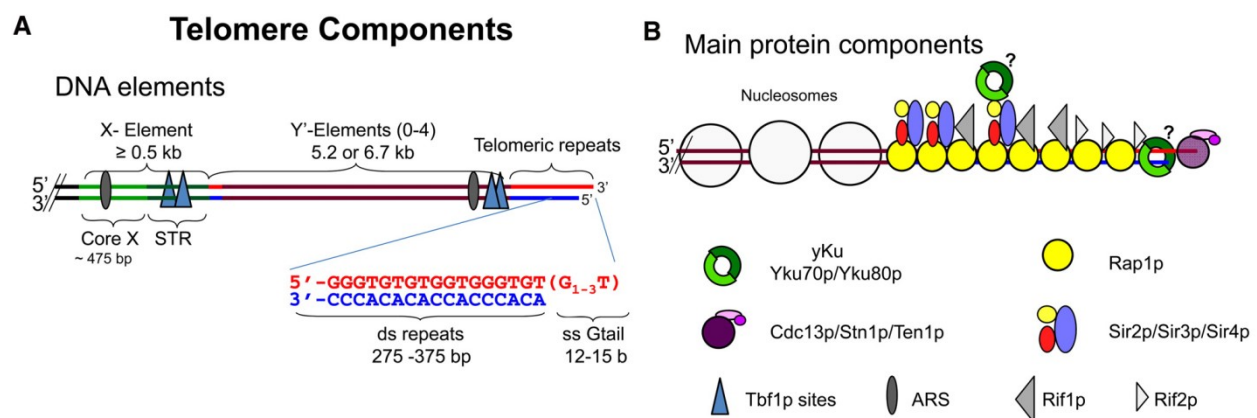


Figure 1. – Structure du télosome.

Organisation des principales caractéristiques des régions télomériques et sous-télomériques. **(A)** La région X du sous-télomère contient une région commune, X-Core, et des répétitions télomériques internes (STR). La région Y' est présente en un assemblage de 0-4 copies. Les deux régions possèdent une origine de réplication (ARS) et des sites de liaison à Tbf1. Le télomère est composé de répétitions TG₍₁₋₃₎ avec une protrusion 3' simple brin d'environ 12-15 nucléotides. **(B)** Le télomère est dépourvu de nucléosomes et est organisé par les protéines télomériques Rap1, qui lient l'ADN télomérique double brin et recrutent le complexe Sir et les protéines Rif1 et Rif2. Le complexe CST lie la protrusion simple brin. Le complexe yKu lie l'extrémité de l'ADN

télomérique double-brin ou est recruté sur les télomères par son interaction avec Sir4. Tiré de (1).

1.1.2. Protéines associées au télomère

Rap1 est une protéine abondante liant l'ADN double brin via deux domaines Myb en tandem (14, 15). La majeure partie des protéines Rap1 se lient ailleurs qu'aux télomères où ils y jouent un rôle de régulateur de la transcription (14, 16). Par contre, Rap1 possède une grande affinité pour les séquences télomériques (17). En effet, chaque 20pb de répétitions contient un site de liaison à Rap1. Ceci permet à la cellule de contrôler la taille des télomères par le nombre de molécules Rap1 qui s'y lie, un télomère de taille normale pouvant lier entre 15 et 20 molécules de Rap1 (18-20). En liant l'ADN double brin télomérique, Rap1 sert de plateforme pour l'interaction avec plusieurs autres protéines télomériques par son domaine C-terminal et est donc central à plusieurs fonctions aux télomères. Témoinant de son importance pour la protection des télomères, la délétion du domaine C-terminal de *RAP1* entraîne des fusions inter-chromosomes, une délocalisation des télomères de la membrane nucléaire, une dérégulation de la transcription sous-télomérique et une déprotection des télomères (17, 21-23) (Fig.1B).

Les protéines Rif1 et Rif2 sont recrutées aux télomères via leur interaction avec Rap1 et elles y jouent des rôles similaires (23). Leur délétion respective entraîne un hyper allongement des télomères et leur double délétion a un effet additif, témoignant de leurs rôles complémentaires pour réguler négativement la longueur des télomères (23, 24). Elles participent, comme Rap1, à protéger les télomères et à établir la taille des télomères pour la cellule par un mécanisme de comptage moléculaire (20). Le nombre de protéines Rap1, Rif1 et Rif2 liées à un télomère établit donc les limites de ce qu'est un télomère court. Ceci est particulièrement utile pour cibler le recrutement de la télomérase aux télomères courts. De plus, Rif2, et partiellement Rif1, protège les télomères de la machinerie de réparation de l'ADN. Rif2 inhibe l'accès aux télomères de la machinerie de NHEJ ainsi qu'aux nucléases et au complexe MRX (composé des protéines Mre11/Rad50/Xrs2), qui jouent un rôle dans le

traitement des DSBs, et à la kinase Tel1 (homologue d'ATM chez la levure) qui est impliquée dans la détection des DSBs (21, 25, 26). Rif1 joue aussi un rôle dans le contrôle des origines de réplication sous-télomérique, s'assurant de leur activation tardive par l'inhibition de leur déclenchement précoce (27-30). Une conséquence de ce rôle de Rif1 est que les télomères courts, ayant moins de sites de liaison pour Rif1, se répliquent plus tôt en phase S, fournissant ainsi un contrôle du moment de réplication des télomères par leur longueur (31). Il est à noter que la kinase Tel1 y joue aussi un rôle. La délétion de *TEL1* permet de découpler la longueur des télomères du moment de leur réplication, ne permettant plus le déclenchement précoce de la réplication aux télomères courts (32) (Fig.1B).

Se liant aussi au domaine C-terminal de Rap1, **le complexe SIR** (Sir2, Sir3 et Sir4) sert principalement à établir l'effet de position télomérique (TPE) (33). Celui-ci est défini comme l'inhibition de la transcription des gènes à proximité des télomères et est dépendant de la longueur des télomères, qui limite le nombre de sites de liaison au complexe SIR. Le complexe SIR est recruté aux télomères via les interactions entre Sir3-Rap1, Sir4-Rap1 et Sir3-Sir4. Sir2 est recruté dans le complexe via une interaction Sir4-Sir2 (34). Sir2 possède une activité de déacétylase d'histones et Sir4 joue un rôle de protéine d'échafaudage, permettant l'assemblage du complexe aux télomères (35). Sir3 permet la propagation du complexe en amont du télomère par sa capacité à lier les histones (36, 37). La propagation de Sir3 est contrôlée par plusieurs facteurs. Premièrement, la longueur des télomères affecte le nombre de sites de liaison au complexe SIR et donc limite la nucléation du processus et par conséquent limite le TPE. Deuxièmement, l'affinité de Sir3 pour les histones, centrale à la propagation du TPE, est amoindrie par les marques d'histones H4K16ac et H3K79me (37). L'activité de déacétylase de Sir2 permet donc d'augmenter la propagation de Sir3 tandis que les activités de méthylases ou d'acétylases d'histones antagonisent cette propagation. Il y a donc un cycle où Sir2, recrutée au télomère via son interaction avec Sir4, déacétyle les histones proches des télomères, créant de nouveaux sites de liaison pour Sir3 qui recrutera de nouveaux complexes SIR et ainsi de suite. Il n'existe pas de barrière fixe établissant la limite de la propagation de Sir3 et de l'inhibition de la transcription. Cette limite est établie par une balance entre l'acétylation des histones par l'acétyl-transférase Sas2 et la déacétylation de ces mêmes histones par Sir2 (38, 39). La

longueur des télomères contrôlant la nucléation du complexe SIR au télomère, le raccourcissement des télomères entraîne le déplacement de la balance et réduit la distance et l'intensité de la répression transcriptionnelle télomérique. Il est à noter que Sir4 joue un rôle supplémentaire dans l'ancrage des télomères à la membrane nucléaire, qui sera discuté plus loin (40-42) (Fig.1B).

Le complexe CST, quant à lui, n'est pas recruté à l'ADN télomérique double brin mais bien à la protrusion simple brin. Il est constitué de 3 protéines, Cdc13, Stn1 et Ten1, et joue un rôle primordial de protection de l'extrémité simple brin (43, 44). Structuellement, ce complexe est similaire au complexe RPA, qui est impliqué dans la réplication et la réparation de l'ADN (45, 46). Cdc13 comporte 4 domaines OB de liaison à l'ADN simple brin, et un domaine d'interaction avec Est1 entre les 2 premiers domaines OB (1). Le premier domaine OB sert de site de liaison avec la sous-unité Pol1 de l'ADN polymérase α et de domaine de dimérisation; le 2^e domaine OB est important pour la localisation nucléaire de Cdc13; le 3^e domaine OB lie l'ADN simple brin et le 4^e domaine OB interagit avec Stn1 (1, 47). L'inactivation de *cdc13* par délétion ou mutation entraîne une déprotection et une instabilité des télomères, et est accompagnée d'une hyper résection de plusieurs kilobases du brin 5'. Cette résection amène un arrêt du cycle cellulaire en G2/M, dû à l'activation de point de contrôle en réponse aux dommages à l'ADN (44, 48-50). Les protéines Stn1 et Ten1 sont aussi importantes pour la protection des télomères. La délétion de ces protéines entraîne une hyper résection des télomères et une activation des points de contrôles (51-54). Stn1 interagit avec Cdc13 par son domaine C-terminal, avec Ten1 par son domaine N-terminal et avec la sous-unité Pol12 de l'ADN polymérase α par son domaine central (1) (Fig.1B).

Cdc13 permet aussi le contrôle du recrutement de la télomérase en phase S pour favoriser l'élongation des télomères (55). La délétion de *cdc13* est la seule délétion qui phénocopie la délétion d'une sous-unité de la télomérase (56). En effet, Cdc13 interagit avec la sous-unité Est1 de la télomérase et cette interaction est centrale pour permettre le recrutement de la télomérase aux télomères (57). Des mutants de *cdc13* ou de *est1* qui inhibent l'interaction Cdc13-Est1 (*cdc13-2* et *est1-60*) ont le même phénotype que la délétion de *CDC13* ou de la

télomérase, soit la sénescence cellulaire, montrant l'importance de cette interaction pour le maintien des télomères (58, 59).

Cdc13 et Stn1 interagissent aussi avec l'ADN polymérase α (60-62). Ces interactions servent à coordonner l'élongation du brin 3' des télomères (ou brin G-riche) par la télomérase et la réplication du brin 5' ou C-riche. En effet, après l'élongation du brin 3' par la télomérase, le brin complémentaire doit être synthétisé par l'ADN polymérase α pour ramener la longueur de l'ADN simple brin à ses 15nt habituels.

Le complexe yKu composé des protéines yKu70 et yKu80 est connu pour jouer un rôle important dans le NHEJ (63, 64). Par contre, il joue aussi plusieurs rôles importants aux télomères (63, 64). Il y est recruté de plusieurs façons, soit par l'interaction non spécifique aux extrémités d'ADN franches, similaire à son recrutement aux DSBs, soit par l'interaction entre yKu80 et Sir4 (65). Il est aussi à noter que yKu est recruté à certain sites sous-télomériques (66, 67). yKu effectue plusieurs fonctions importantes au niveau du télomère. Premièrement, il inhibe la résection profonde jouant ainsi un rôle de protection et de maintien des télomères (25, 68, 69). Deuxièmement, il est impliqué dans la localisation à la membrane nucléaire des télomères (40, 70). Troisièmement, yKu interagit directement avec l'ARN de la télomérase, *TLC1*, et est impliqué dans sa rétention au noyau et son recrutement aux télomères en G1 (71-74) (Fig.1B).

1.2. La télomérase

La machinerie de réplication conventionnelle est incapable de répliquer totalement les extrémités d'ADN dû au problème de fin de réplication. Les polymérases d'ADN ne travaillant que dans la direction 5'-3', la réplication du brin avancé ("leading strand") finit par une extrémité franche et la protrusion simple brin du télomère n'est pas répliquée (Fig.2). La réplication du brin retardé ("lagging strand") commence par une amorce d'ARN à l'extrémité 3' du télomère qui, une fois dégradée, ne peut être remplacée par les polymérases d'ADN induisant une perte

d'information génétique (Fig.2). Pour ces raisons et en l'absence de mécanismes d'élongation, les télomères raccourcissent à chaque division cellulaire jusqu'à entraîner la sénescence ou la mort cellulaire. Pour contrer ce phénomène, les cellules hautement prolifératives ainsi que les organismes unicellulaires, tel que *Saccharomyces cerevisiae*, exprime un complexe ribonucléoprotéique, la télomérase, pour procéder à l'allongement des télomères. Pour allonger les télomères, la télomérase est recrutée aux télomères, s'hybride sur l'ADN télomérique simple brin et, grâce à sa séquence matrice et à son activité de rétro transcriptase, procède à l'élongation des télomères. Par contre, dû à sa capacité à allonger les extrémités d'ADN, le recrutement et l'activité de la télomérase nécessite une régulation précise. Ci-dessous sera décrit les sous-unités principales de la télomérase et leurs rôles ainsi que les mécanismes de régulation de son recrutement.

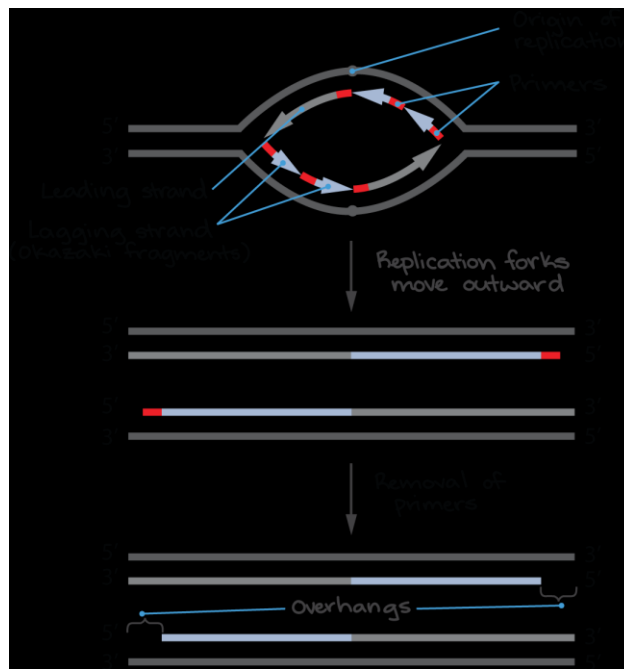


Figure 2. – Le problème de fin de réplication.

La réplication du génome entraîne la formation d'extrémités différentes dépendamment du brin utilisé comme matrice. La synthèse se fait obligatoirement dans l'orientation 5'-3' et nécessite une amorce d'ARN pour commencer la polymérisation. Cette amorce est ensuite dégradée et

remplacée par polymérisation. La synthèse du brin avancé ("leading strand") se fait de façon continue jusqu'à l'extrémité et va donc se terminer avec une extrémité franche. La synthèse discontinue du brin retardé ("lagging strand") entraîne la formation de fragments d'Okazaki dû à l'orientation de la synthèse et du besoin d'amorcer la polymérisation à de multiples endroits. Cela a pour effet que l'extrémité du brin retardé finira par une amorce qui ne pourra pas être remplacée après sa dégradation. Cela mène à la formation d'une extrémité simple brin et d'une perte d'information génétique à chaque division cellulaire. Tiré de (75).

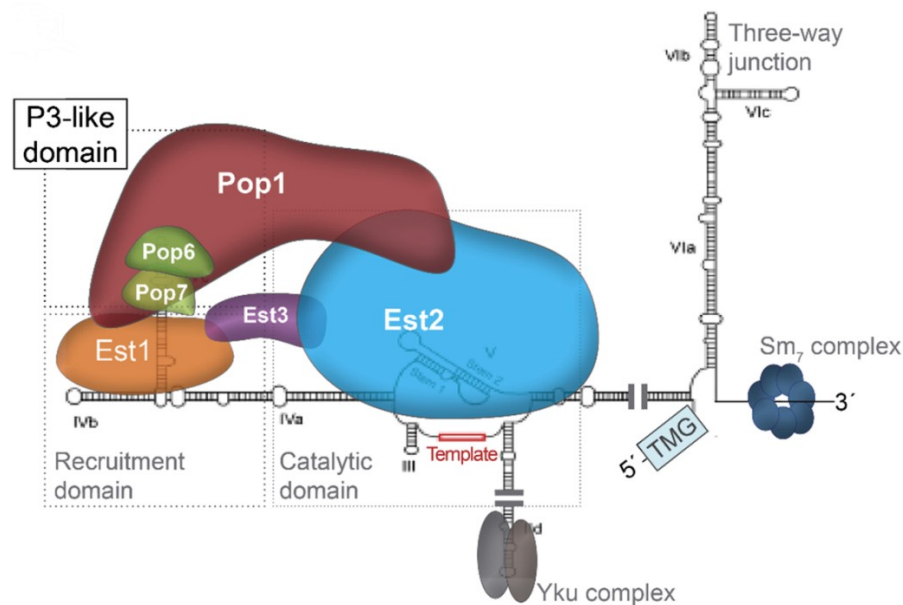


Figure 3. – Structure de la télomérase.

Organisation des sous-unités de la télomérase. L'ARN *TLC1* est très structuré, sert d'échafaudage au complexe, et fournit la matrice pour synthétiser les télomères. L'ARN de la télomérase s'articule autour d'un pseudo nœud central et se replie en trois bras principaux. Le pseudo-nœud possède la matrice et interagit avec Est2. Les extrémités 5' et 3' ainsi que le site de liaison des protéines Sm sont situés sur le premier bras. Les tiges VIa, VIb et VIc forment une jonction à trois voies nécessaire pour l'activité de la télomérase. yKu lie la tige-boucle IId, à l'extrémité du 2^e bras de *TLC1*. Est1 est recruté via la tige boucle IVb et la tige-boucle CS2 du 3^e bras. Ce dernier se termine par une autre tige-boucle, CS2a, qui lie les protéines Pop (Pop1,

Pop6, Pop7). Est3 est recrutée dans le complexe via ses interactions avec Est1 et Est2 et la liaison de Est2 avec *TLC1* est stabilisée par les protéines Pop. Tiré de (76).

1.2.1. Les sous-unités de la télomérase

La télomérase comporte une sous unité ARN nommée *TLC1* chez la levure servant d'échafaudage au complexe et possédant la séquence matrice, ainsi que plusieurs sous-unités protéiques (77) (Fig.3).

La sous-unité possédant l'activité enzymatique du complexe est nommée **Est2** (78, 79). Elle possède des homologies de séquences avec la famille des rétro-transcriptases et est conservée au cours de l'évolution (79-81). Est2 utilise la séquence matrice de la sous-unité ARN, *TLC1*, pour son activité et nécessite une amorce d'ADN avec un groupement 3' hydroxyle pour amorcer la polymérisation (82). Ces deux sous-unités sont suffisantes pour reproduire une activité enzymatique *in vitro* (79). Est2 est une protéine peu abondante, (environ 40 molécules par cellule) et interagit avec *TLC1* et Est3 (83-86) (Fig.3).

TLC1 est la sous unité ARN du complexe et fait 1157nt (86, 87). Elle est peu abondante (environ 30 molécules par cellule) (87, 88). Son extrémité 5' possède une coiffe tri-méthyl guanosine (TMG) générée par la méthyl-transférase Tgs1 dans le nucléole, et son extrémité 3' possède 2 formes : une forme polyadénylée et une forme non-polyadénylée (87, 89, 90). La forme non-polyadénylée est plus courte de 90 nucléotides et est considérée comme la forme mature (87). Longtemps, la forme polyadénylée a été considérée comme un précurseur qui par clivage de l'extrémité 3' est convertie en forme mature. Par contre, il a été démontré que la forme non-polyadénylée est générée par un mécanisme indépendant impliquant la terminaison par le complexe Nrd1-Nab3-Sen1 (87, 91). Celui-ci agit de concert avec l'exosome et le complexe TRAMP pour procéder au traitement et à la maturation de l'extrémité 3' (87, 91). La présence de cette voie de maturation de l'extrémité 3' remet en question la fonction de la forme polyadénylée. En effet, seulement la forme non-polyadénylée est retrouvée dans le complexe

téломérase et la perturbation du signal de polyadénylation n'affecte pas la longueur de l'ARN (87, 92). La présence du complexe Sm stabilise l'extrémité 3' et bloque sa dégradation (87, 93). *TLC1* est très structuré et sert d'échafaudage au complexe. Il peut être réduit à une taille de moins de 400nt et maintenir la fonctionnalité de l'enzyme *in vivo*, suggérant que l'architecture de l'ARN permet un assemblage modulaire de la téломérase. Ainsi, la longueur de certains domaines permettrait une flexibilité et une régulation de l'assemblage de la téломérase (94). La structure de l'ARN *TLC1* s'articule autour d'un domaine catalytique qui consiste en un pseudo-nœud essentiel au positionnement de la séquence matrice, à l'interaction avec l'ADN simple brin et à l'interaction avec Est2 (95, 96). *TLC1* possède 3 bras principaux articulés autour du pseudo-nœud (97-99). Le premier bras (tiges VIa, VIb et VIc) comporte une jonction à trois voies, importante pour l'activité de la téломérase, les extrémités 5' et 3' et le site de liaison aux protéines Sm (100). Le deuxième bras comporte, à son extrémité, la tige-boucle IId responsable de la liaison au complexe γ Ku (101). Le troisième bras lie la sous-unité Est1 par la tige-boucle IVb et la tige-boucle ("bulged stem-loop") CS2 (102). Ce bras lie également les protéines Pop par la tige-boucle CS2a située dans un domaine similaire à un domaine P3 ("P3-like domain") (76, 95, 103) (Fig.3).

L'assemblage de l'holoenzyme nécessite un trafic nucléocytoplasmique de l'ARN *TLC1*, qui est exporté au cytoplasme par les exportines Crm1 et Mex67, où l'holoenzyme est assemblée et celui-ci est réimporté dans le noyau via les importines Mtr10 et Kap122 (74). La délétion de *YKU70* induit une accumulation cytoplasmique de l'ARN *TLC1*, démontrant un rôle du complexe γ Ku dans ce trafic (74). Il est suggéré que ce trafic nucléoplasmique de l'ARN *TLC1* permet un contrôle de l'assemblage de l'holoenzyme, limitant la réimportation de complexes mal assemblés. γ Ku joue aussi un rôle dans l'interaction de la téломérase avec les télomères, notamment en phase G1 (71-73).

La sous-unité **Est1** est impliquée dans le recrutement de la téломérase aux télomères *in vivo* grâce à son interaction avec Cdc13. Démontrant la nécessité de cette interaction, le mutant *cdc13-2*, qui ne permet plus l'interaction entre Cdc13 et Est1, entraîne un raccourcissement des télomères et la sénescence (57). Par contre, l'expression simultanée du mutant *est1-60* supprime le phénotype de *cdc13-2*. Ceci est expliqué par le fait que les deux mutations

induisent un inversement de charge des acides aminés impliqués dans l'interaction et donc leur expression simultanée rétablit leur interaction. De plus, une fusion entre Est2 et Cdc13 permet le recrutement de la télomérase même en l'absence de Est1, confirmant le rôle de Est1 (59). La fusion entre Cdc13 et Est1 ou Est2 mène aussi à une hyper élévation des télomères (59). Cela suggère que le maintien de la taille des télomères passe en partie par la régulation de l'interaction Est1-Cdc13. Est1 est la seule sous-unité dont l'abondance est régulée par le cycle cellulaire, étant très faible en G1 (environ 20 molécules) et augmentant en phase S (environ 110 molécules) (104) (Fig.3).

Est3 n'interagit pas directement avec l'ARN *TLC1* mais est recruté dans le complexe par ses interactions avec Est1 et Est2 (105). La présence de ces deux protéines est nécessaire pour stabiliser le recrutement de Est3 (105). La délétion de *EST3* entraîne le raccourcissement des télomères et la sénescence (56, 106). Par contre, son rôle précis n'est toujours pas connu (Fig.3).

Les protéines **Pop1**, **Pop6** et **Pop7** sont des sous-unités des complexes ribonucléoprotéiques RNase P et RNase MRP qui procèdent à la maturation de certains ARN (107, 108). Le complexe RNase P est impliqué dans la maturation des ARN de transferts en clivant l'extrémité 5' des ARN précurseurs (107). Le complexe RNase MRP est impliqué dans la maturation des ARN mitochondriaux, de l'ARN ribosomal 35S et de l'ARN messager de la cycline B2 (107). Le rôle des protéines Pop dans ces complexes est de s'assurer du bon repliement de la sous-unité ARN de ces complexes en plus d'aider à la reconnaissance de leurs substrats respectifs (107). La fonction des protéines Pop dans le complexe de la télomérase est semblable. Leur mutation entraîne un mauvais repliement de la région CS2a de l'ARN *TLC1* et une déstabilisation de l'interaction entre l'ARN *TLC1* et Est1 (109). Ces effets entraînent une rétention cytoplasmique de la télomérase, probablement due à son mauvais assemblage, à un raccourcissement des télomères et une augmentation de l'expression de l'ARN *TLC1* (109). De plus, la présence de Pop1 augmente l'activité de la télomérase *in vitro* (76) (Fig.3).

1.2.2. Recrutement de la télomérase aux télomères

La régulation de la taille des télomères passe par la coordination de leur réplication et de leur allongement. Suivant la réplication des télomères, le brin 3' est réséqué et allongé par la télomérase. Puis, le brin 5' complémentaire sera synthétisé. Une partie de la coordination de la réplication se fait via l'action de Rif1 et Tel1, alors que la coordination de la synthèse du brin 5' se fait par l'action de Cdc13 et Stn1 (Fig.4).

Dû au problème de fin de réplication, la synthèse à partir du brin avancé finit en extrémité franche. Par contre, la protrusion simple brin est nécessaire pour la stabilité et la protection des télomères. Une étape de résection est donc nécessaire. La résection entraîne la formation d'ADN simple brin de 30-100nt en fin de phase S et joue un rôle dans la régulation du recrutement et de l'activité de la télomérase (110).

Cette résection est effectuée par des mécanismes similaires aux sites de cassures d'ADN et implique plusieurs nucléases (111). Le complexe MRX et l'endonucléase Sae2 sont responsables de la majorité de la résection (5, 111). Aux sites de cassures d'ADN, le complexe MRX, composé des protéines Mre11, Rad50 et Xrs2, est responsable de la reconnaissance du dommage, de l'initiation de la signalisation et de la réparation (112-114). Il est aussi responsable de maintenir les extrémités de la cassure à proximité, de recruter et activer la kinase Tel1 pour coordonner la réponse aux dommages à l'ADN (112-114). La sous-unité Mre11 effectue une cassure simple brin sur l'extrémité 5' ce qui permet la résection 3'-5' par Mre11 et Sae2 sur plus de 300 nucléotides (112, 115-117). Rad50 est impliqué dans la liaison et l'ancrage des extrémités d'ADN et possède un domaine ATPase (112, 118, 119). La liaison à l'ATP est importante pour l'ancrage du complexe MRX aux extrémités de l'ADN et pour la ligation des extrémités d'ADN tandis que l'hydrolyse de l'ATP est importante pour la résection de l'ADN (112, 120-122). La sous-unité Xrs2 est responsable de l'import nucléaire du complexe et joue un rôle dans la ligation des extrémités d'ADN et l'activation de Tel1 (112, 123, 124). Bien que le complexe MRX et Sae2 et la résection soient responsables de la majorité des télomères, la délétion de *MRE11* ou de *SAE2* n'élimine pas totalement la résection, témoignant d'une

seconde voie de résection (5, 111). Aux sites de DSBs, la résection continue sur plusieurs kilobases dû au recrutement de l'hélicase Sgs1 et de nucléases supplémentaires comme Exo1 et Dna2 qui sont responsables de la résection profonde (111). Par contre, aux télomères, ce basculement vers une résection profonde est inhibé par le complexe γ KU et Cdc13 (25) (Fig.4).

Une autre fonction du complexe MRX est de recruter la kinase Tel1 aux télomères via une interaction entre Xrs2 et Tel1 (125, 126). La délétion de *TEL1* produit des télomères courts mais stables, ce qui suggère un rôle de Tel1 dans le maintien des télomères (127-129). L'activité kinase de Tel1 est nécessaire au maintien de la taille des télomères, suggérant que Tel1 phosphoryle une ou plusieurs protéines télomériques pour faciliter le recrutement de la télomérase (130). Une cible potentielle est la protéine Cdc13 qui possède 11 sites pouvant être phosphorylés par Tel1 (131). De plus, *in vitro*, Tel1 phosphoryle Cdc13 sur 3 de ces sites et la mutation simultanée de deux de ces sites induit un phénotype similaire à la délétion de *CDC13*, phénotype supprimé par la fusion entre Est1 et Cdc13 (131). Bien qu'il existe des données suggérant que Cdc13 ne serait pas une cible de Tel1 (132), ces résultats suggèrent que Tel1 jouerait un rôle dans la régulation de l'interaction entre Cdc13 et la télomérase. Bien qu'impliquée dans la réponse aux dommages à l'ADN, le recrutement de Tel1 aux télomères n'induit pas une activation des points de contrôle (Fig.4).

La résection est importante pour augmenter le recrutement de Cdc13 et pour fournir un substrat à la télomérase. La résection est donc une première façon de réguler le recrutement de la télomérase aux télomères. De plus, le recrutement de la télomérase nécessite l'interaction entre la sous-unité Est1 et Cdc13. Cette interaction est la dernière étape permettant le recrutement de la télomérase et est régulée en fonction du cycle cellulaire et en fonction de la taille des télomères (Fig.4).

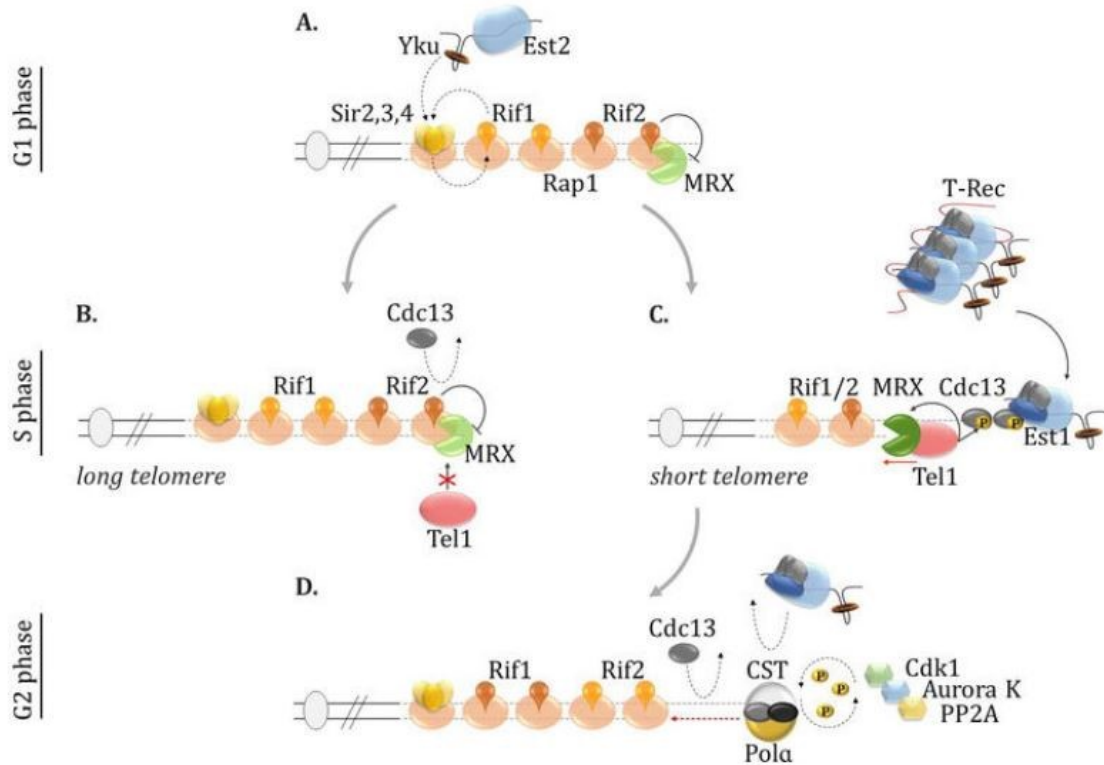


Figure 4. – Régulation du recrutement de la télomérase aux télomères.

(A) Durant la phase G1, la télomérase peut être recrutée via les interactions Sir4-yKu-TLC1. Par contre, cela ne mène pas à un allongement des télomères. Cet allongement n'est pas permis car le recrutement du complexe MRX est inhibé par Rif2. De plus, Est1 et Est3 n'ont pas été recrutés au complexe. **(B)** Durant la phase S, les longs télomères ne recrutent pas la télomérase. La grande quantité de Rif2 à ces télomères inhibe le recrutement de Tel1 et Rap1 inhibe l'activité du complexe MRX. L'absence de résection empêche l'accumulation de Cdc13. **(C)** Les télomères courts possédant moins de Rif2, permettent le recrutement de Tel1 et l'activité du complexe MRX. Le complexe MRX procède à une résection, ce qui permet l'accumulation de Cdc13. Tel1 phosphoryle Cdc13 et permet l'interaction entre Cdc13 et la télomérase via sa sous-unité Est1. De plus, les télomères courts stimulent l'assemblage de T-Recs pour concentrer l'activité de la télomérase. **(D)** En G2, la régulation de la phosphorylation du complexe CST permet de coordonner la transition entre l'interaction avec la télomérase et l'interaction avec l'ADN polymérase α pour permettre la synthèse du brin complémentaire. Tiré de (77).

1.2.3. Régulation du recrutement de la télomérase aux télomères

La régulation de la télomérase en fonction du cycle cellulaire passe par plusieurs mécanismes. En effet, l'activité de la télomérase est restreinte à la fin de la phase S, ce qui coïncide avec l'accumulation de Cdc13 permise par la résection aux télomères (110). Cdk1 phosphoryle aussi Cdc13 et cette phosphorylation affecte son interaction avec Est1 (133). Cdc13 est aussi SUMOylée en début de phase S ce qui renforce l'interaction entre Cdc13 et Stn1 et limite l'activité de la télomérase (134) (Fig.4).

La régulation de l'assemblage de la télomérase permet aussi une régulation dépendante du cycle cellulaire. L'induction de l'expression de Est1 en phase S régule son association avec le complexe de la télomérase (104). En G1, il y a 3 fois plus de complexes *TLC1*-Est2 que de complexes *TLC1*-Est2-Est1, tandis qu'en phase S, il y a autant de Est1 que de Est2 associés à l'ARN *TLC1* (105, 135). Cette association de Est1 à la télomérase permet aussi de réguler l'association de Est3 qui a besoin de la présence de Est2 et de Est1 pour être stabilisée dans le complexe (105). En phase G2, Est2 est retirée de l'holoenzyme par un mécanisme inconnu ce qui inhibe l'activité de la télomérase durant la mitose (105) (Fig.4).

On peut voir l'effet de ces mécanismes par l'augmentation de la présence de la télomérase aux télomères en fin de phase S avec une approche d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) (83, 104). Par contre, Est2 peut être détectée aux télomères par ChIP tout au long du cycle cellulaire et cette localisation dépend de l'ARN *TLC1* et du complexe γ Ku (72, 74). Cependant, par des expériences d'imagerie des molécules uniques de l'ARN *TLC1* en cellules vivantes, il a été observé que la télomérase est très mobile en phase G1 et que l'association de la télomérase aux télomères à l'extérieur de la phase S est transitoire et donc ne peut mener à l'allongement des télomères (136). De plus, une mutation de γ Ku80 ne permettant plus le recrutement de Est2 aux télomères en phase G1 n'entraîne qu'un effet mineur sur la taille des télomères (101). Par contre, en phase S, on peut remarquer l'accumulation de plusieurs molécules de télomérase dans un focus moins mobile et localisé aux télomères (136). Ceux-ci ont été nommés T-Recs pour « Telomerase REcruitment ClusterS » et correspondent à une

accumulation de 6-15 molécules de télomérase pour allonger les télomères (136). La formation des T-Recs est régulée par les mécanismes de recrutement de la télomérase. En effet, la délétion de *RIF1* et de *RIF2*, protéines limitant le recrutement de la télomérase, entraîne la formation de T-Recs peu importe la phase du cycle cellulaire et entraîne un hyper allongement des télomères (136). À l’opposé, la délétion de protéines jouant un rôle dans le recrutement de la télomérase, tels que des constituants du complexe MRX ou de *TEL1* ou bien la mutation *cdc13-2*, diminue drastiquement la formation de T-Recs (136) (Fig.4).

Le raccourcissement des télomères induit une formation accrue de T-Recs La formation de ces complexes est donc aussi affectée par la taille des télomères et pourrait représenter une façon de concentrer l’activité de la télomérase pour la cibler aux télomères les plus courts (136). En effet, durant un cycle cellulaire, seulement 10% des télomères sont rallongés (137). Par contre, environ 50% des télomères de moins de 100pb sont rallongés démontrant un biais d’élargissement pour les télomères plus courts (137). De plus, les télomères très courts sont rallongés de façon plus extensive que les télomères de taille moyenne (137). Le recrutement de la télomérase et son activité sont donc régulés par la taille des télomères.

Les protéines du complexe MRX et la kinase Tel1 sont connues pour être recrutées préférentiellement aux télomères courts (138-140). À la base de cette préférence se trouve la sous-unité Xrs2 du complexe MRX. Rif2 et Tel1 se disputent la liaison au même domaine de Xrs2, et Rif2 peut donc empêcher le recrutement de Tel1 (21, 26, 140). La délétion de *RIF2* supprime la localisation préférentielle de Tel1 aux télomères courts et leur allongement préférentiel par la télomérase (138). Les télomères courts, ayant moins de protéines Rif2, permettent donc l’interaction de Tel1 avec Xrs2. Aussi, l’interaction Tel1-Xrs2 renforce la liaison du complexe MRX aux télomères et en l’absence de Tel1, Rap1 inhibe cette interaction, expliquant donc la localisation préférentielle du complexe MRX aux télomères courts (26) (Fig.4).

1.3. La localisation des télomères à la membrane nucléaire

Bien qu'il y ait 32 télomères dans une levure *Saccharomyces cerevisiae* haploïde, l'observation par immunofluorescence des protéines associées aux télomères ne démontre que 4-6 foci périnucléaires (141, 142). Ceci est expliqué par l'ancrage des centromères au pôle du fuseau mitotique (SPB), fournissant une première contrainte à la localisation des télomères, et par la localisation périnucléaire de ceux-ci (142, 143). Le volume du nucléole limite aussi leur localisation car les télomères sont exclus du nucléole (142). L'étude de la dynamique des télomères démontre que, bien que localisés à la membrane nucléaire, ceux-ci sont mobiles et que l'agrégation entre télomères n'est pas due à une interaction stable mais plutôt à de multiples interactions faibles et transitoires (142, 144-146).

L'interaction entre les télomères et la membrane nucléaire n'est pas une association stable. En effet, un télomère se localise à la membrane dans seulement 50-60% des cellules (147). De plus, l'imagerie en temps réel des télomères démontre une mobilité des télomères le long de la membrane et plusieurs cycles d'association-dissociation (148). La localisation à la membrane est régulée par le cycle cellulaire, les télomères y étant plus localisés en phases G1/S et ils sont relâchés de la membrane durant la mitose (148).

Le rôle de cette localisation semble être, en partie, d'augmenter la concentration locale en protéines télomériques. La formation de foci périnucléaires aiderait donc à établir des zones où, par exemple, la quantité de complexe SIR est plus élevée et donc favorise le TPE. En effet, en forçant la localisation à la membrane, le TPE est renforcé et en empêchant la localisation à la membrane, le TPE est diminué (70, 147-149).

Les voies de localisations des télomères à la membrane nucléaire impliquent le complexe yKu, Sir4 ainsi que la télomérase (70, 141, 148, 150). La délétion de *YKU80* ou de *SIR4* entraîne une délocalisation partielle des télomères tandis que leur délétion simultanée entraîne une localisation nucléaire aléatoire des télomères, suggérant l'existence de voies redondantes, yKu jouant un rôle en G1 et en phase S alors que la voie dépendante de Sir4 est plus importante en

phase S (148). Il a été démontré que yKu peut induire la localisation des télomères à la membrane indépendamment de Sir4 et que Sir4 peut l'induire d'au moins deux façons, l'une impliquant yKu et l'autre impliquant une protéine localisée à la membrane, Esc1 (40, 149). Sir2 est aussi capable d'induire la localisation membranaire, mais celle-ci est dépendante de Sir4 (40). La localisation induite par yKu80 possède également des sous-voies, une en G1 nécessitant yKu70 et une en phase S impliquant Esc1(40).

La protéine Mps3 joue aussi un rôle important dans la localisation membranaire des télomères. Mps3 fait partie des protéines à domaine SUN (Sad1-UNC-84) qui composent la membrane nucléaire chez les eucaryotes (151, 152). Ceux-ci ont leur C-terminal enfoui dans la membrane et leur N-terminal libre dans le nucléoplasme, leur permettant ainsi d'ancrer des protéines à la membrane et jouent un rôle dans l'agrégation des télomères (151-153). Le rôle de Mps3 dans la localisation des télomères à la membrane est cependant minoritaire en G1 mais important en phase S (42). Mps3 semble être un site d'ancrage des télomères via une interaction avec Sir4. En effet, l'induction de la localisation membranaire de la chromatine par la liaison forcée de Sir4, indépendamment de Esc1, est supprimée par une mutation de *mps3* ne permettant plus d'interagir avec Sir4 (42).

Les sous-unités de la télomérase sont aussi impliquées dans ces voies. L'interaction forcée de Est2 au télomère induit une localisation membranaire de façon indépendante à Esc1 (154). En phase S mais pas en phase G1, la localisation induite par Est2 dépend de Est1. De plus, la localisation induite par yKu80 en phase S dépend de *TLC1* et de Est1 (154). La dépendance différente aux sous-unités de la télomérase selon le cycle cellulaire peut être expliquée par la régulation de l'assemblage de la télomérase selon le cycle cellulaire (105, 135). Toutefois, toutes ces voies semblent être dépendantes de Mps3 car la mutation de cette protéine supprime la localisation induite par la liaison forcée de yKu80 et de Est2 (154). De plus, Mps3 peut interagir avec Est1 *in vitro* (153).

À travers la contribution de toutes ces voies, 50-60% des télomères endogènes sont localisés à la membrane en G1 et en phase S (42, 154). En G1, cette localisation est

indépendante de Mps3 et de Sir4 tandis qu'en phase S, Sir4 et Mps3 agissent dans la même voie pour localiser 20% des télomères (154).

Il est à noter que les télomères peuvent aussi se localiser aux pores nucléaires. Par contre, la localisation aux pores nucléaires est liée à la réparation des télomères et ce sont les télomères abimés qui s'y localisent (40, 148, 155). De plus, en l'absence de télomérase, la localisation aux pores nucléaires semble permettre le maintien des télomères via des voies de recombinaison (42, 155).

1.4. TERRA (telomeric repeats containing RNA)

Dû à la présence d'hétérochromatine dans les régions sous-télomériques et du TPE, les télomères ont longtemps été considérés comme non-transcrits. En 2007, il a été découvert que les télomères sont transcrits en un long ARN non-codant (lncRNA) contenant des répétitions télomériques nommé TERRA (telomeric repeats containing RNA) (156). Depuis, l'étude de la transcription télomérique a mené à la découverte d'autres lncRNAs dans cette région du génome.

TERRA est un ARNnc issu de la transcription par l'ARN polymérase II des télomères (156, 157). Sa transcription commence dans le sous-télomère et se termine dans les répétitions télomériques. TERRA est hétérogène en taille et fait entre quelques centaines de nucléotides jusqu'à 1,2kb avec une moyenne autour de 400nt (158, 159). La grande variation de la taille dépend de la longueur du télomère et du site d'initiation de la transcription (TSS). Dû à la grande hétérogénéité des séquences sous-télomériques, peu de TSS ont été caractérisés et il est fort probable que ceux-ci soit différents d'un télomère à l'autre ou bien que la transcription de TERRA peut s'amorcer à plusieurs endroits (160, 161). Chez l'humain et *S. pombe*, environ 7-10% de TERRA est polyadénylée tandis que chez *S. cerevisiae*, il semblerait que la totalité de TERRA est polyadénylée, bien que des résultats contradictoires existent (159, 162-164). Chez l'humain et *S. pombe*, la polyadénylation de TERRA génère une séparation de localisation et possiblement

de fonction, la forme non-polyadénylée restant associée aux télomères et la forme polyadénylée se localisant dans le nucléoplasme (162, 163).

1.4.1 Contrôle des niveaux d'expression de TERRA

L'expression de TERRA est régulée en fonction du cycle cellulaire. Son expression est maintenue basse mais augmente en fin de phase G1 (165). La régulation de TERRA passe par l'inhibition de sa transcription et par sa dégradation co-transcriptionnelle par l'exonucléase Rat1 (159, 165, 166). La présence de Rat1 aux télomères dépend des protéines Rif1 et Rif2 (165, 166). De plus, Rap1 joue un rôle activateur de l'activité exonucléase de Rat1 (159, 166). Il y a aussi des évidences que le complexe TRAMP, responsable de l'ajout de courtes séquences poly(A) à des ARNnc servant de base pour leur dégradation par l'exosome, participe à la dégradation de TERRA (167). La transcription de TERRA est inhibée par le complexe régulateur de l'élongation de la transcription Paf1 et par les protéines télomériques du complexe Sir (164, 166) (Fig.4).

Ces mécanismes permettent une régulation de TERRA en fonction de la longueur des télomères. En effet, la régulation via Rat1 est dépendante de Rap1, Rif1 et Rif2. Un télomère court possède moins de site de liaison pour ces protéines ce qui diminue ainsi le recrutement et l'activité de Rat1. De plus, un télomère court recrute moins de complexes SIR, ce qui suggère une levée de l'inhibition de l'expression de TERRA aux télomères courts. Par conséquent, il n'est pas surprenant d'observer une augmentation de l'expression de TERRA dans des cellules délétées de *TLC1* (165, 168). Cette augmentation d'expression est essentielle à sa fonction et sera expliqué dans le prochain chapitre (Fig.5).

1.4.2 Fonctions de TERRA

Étant donné la complémentarité de séquence entre les répétitions télomériques de TERRA et la séquence matrice de l'ARN *TLC1*, le premier rôle suggéré pour TERRA fut d'agir comme inhibiteur compétitif de la télomérase. En effet, un oligonucléotide possédant des séquences télomériques peut lier hTR (ARN de la télomérase) et hTERT (rétrotranscriptase de la télomérase) et inhiber l'activité de la télomérase chez l'humain (157, 169). De plus, par immunoprécipitation, il a été démontré chez l'humain et la souris que TERRA pouvait interagir avec la télomérase (169, 170). Par contre, il n'y a aucune évidence *in vivo* qu'un tel mécanisme prenne place et plusieurs résultats contradictoires existent quant au lien entre l'expression de TERRA, la taille des télomères et l'activité de la télomérase dans différentes lignées cellulaires cancéreuses (157, 171, 172). De plus, l'expression ectopique de TERRA dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses, bien qu'elle induit une diminution de l'activité de la télomérase *in vitro*, ne provoque pas un raccourcissement des télomères (173). Finalement, l'augmentation artificielle de l'expression de TERRA dans différents modèles cellulaires ne semble pas être corrélée avec une inhibition de l'activité de la télomérase ou une diminution de la taille des télomères (174, 175). Ces résultats sont discutés plus amplement dans l'annexe 3 (176) et, bien que certains résultats sont contradictoires, ils suggèrent que l'expression de TERRA n'interfère pas avec l'activité de la télomérase *in vivo*.

L'étude de la fonction de TERRA chez la levure a longtemps été compliquée par le faible niveau d'expression de TERRA dans cet organisme. Pour permettre la détection et la quantification de TERRA, l'altération artificielle de son expression par l'utilisation du mutant thermosensible *rat1-1* ou de promoteurs artificiels inductibles a souvent été utilisé (159, 177, 178). Les premières études utilisant un promoteur inductible introduit en amont des répétitions télomériques ont démontrés que la transcription forcée de TERRA induit un raccourcissement de ce télomère (177, 178). L'augmentation de l'expression de TERRA dans un mutant *rat1-1* provoque aussi un raccourcissement des télomères (159). Ces résultats suggèrent que l'augmentation de l'expression de TERRA perturbe les processus de maintien de la taille des télomères.

Pour élucider les mécanismes par lesquels TERRA favorise le raccourcissement des télomères chez la levure, le groupe du Dr. Lingner, après avoir identifié le TSS de TERRA transcrit à partir du télomère 1L (tel1L-TERRA), a introduit un promoteur inductible à la doxycycline en amont de ce TSS(160). Ils ont démontré que le raccourcissement induit par la transcription forcée de TERRA ne passait pas par l'inhibition de la télomérase mais par la stimulation de la résection à longue distance par l'exonucléase Exo1 (160). Une autre étude utilisant un promoteur inductible au galactose (GAL1) a démontré que le raccourcissement des télomères induit par la transcription forcée de TERRA était dû à une interférence de la transcription avec la machinerie de réplication et non à l'inhibition de la télomérase (178). L'augmentation de la transcription télomérique non-régulée peut interférer avec les fourches de réplication et induire leur affaissement. De plus, la surexpression de la RNase H1 supprime le phénotype causé par l'utilisation du mutant thermosensible *rat1-1* (159). Ceci suggère que la formation d'hybride TERRA/ADN est à l'origine du raccourcissement des télomères obtenus dans cette souche, possiblement en interférant avec les fourches de réplication. De plus, certaines conditions augmentant l'expression de TERRA, telles que la délétion des protéines du complexe SIR ou la délétion de certaines protéines du complexe PAF, ne conduisent pas à un raccourcissement des télomères (164, 166). Ensemble, ces résultats suggèrent que, plus que l'accumulation de TERRA, sa transcription non-régulée interfère avec les processus cellulaires prenant place aux télomères et est à la base des phénotypes de raccourcissement des télomères.

Pour circonvenir les problèmes liés à l'altération des niveaux endogènes de l'expression de TERRA, des approches d'imagerie ont été développées pour étudier TERRA dans des conditions d'expression endogène (168, 179). L'utilisation d'hybridation in situ fluorescente d'ARN (RNA FISH) pour étudier la transcription de TERRA issu de la transcription de télomères uniques (télomères 1L, 6R), ou des télomères Y', a révélé que TERRA peut échapper à la répression transcriptionnelle et à la dégradation co-transcriptionnelle chez environ 15-28% des cellules pour former un focus périnucléaire (168). De plus, la détection simultanée dans la même cellule de TERRA transcrit à partir de 2 télomères différents est très rare. Pour confirmer ces résultats, une approche d'imagerie en cellules vivantes de l'ARN a été développée. Brièvement, l'introduction de tiges-boucles MS2 à un télomère unique en amont des répétitions

télomériques permet la transcription endogène d'ARN TERRA possédant des tiges-boucles MS2 entre la partie sous-télomérique de sa séquence et les répétitions télomériques de sa séquence (MS2-TERRA). La coexpression de la protéine de fusion MCP-GFP, qui se lie de façon spécifique aux tiges-boucles MS2 permet de détecter, via la fluorescence de la GFP, les molécules de MS2-TERRA issues de ce télomère (180). Par cette approche, il a été démontré que MS2-TERRA transcrit à partir du télomère 1L ou 6R ne forme un focus que chez 10% des cellules (168). Ce pourcentage de cellules exprimant TERRA, bien que légèrement différent des pourcentages observés par RNA FISH, confirme que seulement une minorité de cellules exprime TERRA à partir d'un télomère donné. Cette minorité de télomères exprimant TERRA sont des télomères courts et la longueur des télomères semble être liée à l'expression de TERRA. En effet, la délétion de l'ARN *TLC1*, menant au raccourcissement de tous les télomères, augmente l'expression simultanée de TERRA issue de la transcription de tous les télomères testés et le raccourcissement artificiel d'un télomère augmente aussi l'expression de TERRA transcrit à partir de celui-ci (168). Ces résultats confirment que l'expression de TERRA est maintenue à un niveau bas mais que les télomères courts échappent à cette répression, permettant aux molécules d'ARN TERRA de s'accumuler sous la forme d'un focus périnucléaire.

La caractérisation de ces foci de TERRA a démontré que ceux-ci ne sont pas stablement associés aux télomères mais démontrent une dynamique plus libre (168). De plus, l'imagerie simultanée de MS2-TERRA et de son télomère d'origine, par l'introduction de séquences TetO dans le sous-télomère et par l'expression d'une protéine de fusion TetR-RFP, démontre que durant une période de 30 minutes (une acquisition prise à chaque 2 minutes), 70% des foci MS2-TERRA vont colocaliser au moins une fois avec leur télomère d'origine (168). Par contre, pour la même période de temps, seulement 9% des foci MS2-TERRA vont colocaliser avec un autre télomère de la même façon (168). Cette interaction préférentielle avec son télomère d'origine a aussi été démontrée par des expériences de ChIP et témoigne probablement d'un rôle joué *in cis* (168) (Fig.5).

Les télomères courts, en plus d'induire l'expression de TERRA, induisent la formation d'agrégats de télomérase (ou T-Recs) et les deux sont recrutés aux télomères courts. Pour identifier le rôle de la transcription de TERRA, la relation entre ces foci a donc été étudiée. En

utilisant l'imagerie simultanée de PP7-TERRA (un système de marquage de l'ARN similaire au système MS2) et de MS2-*TLC1*, il a été montré que plus de 90% des foci PP7-TERRA colocalisent avec un focus MS2-*TLC1* (168). Cette interaction a aussi été confirmée par la co-immunoprécipitation réciproque de TERRA avec la télomérase, suggérant que le rôle de TERRA à son télomère d'origine implique probablement son interaction avec la télomérase (168). L'imagerie en vidéo intermittente ("timelapse") de cellules en phase S a permis de caractériser ce rôle. En effet, en plus d'interagir ensemble, les molécules de MS2-*TLC1* s'accumulent sur le focus TERRA pour former un T-Recs (168). Cela suggère un rôle de TERRA dans la nucléation des T-Recs. De plus, après la formation de T-Recs sur le focus TERRA, ceux-ci sont ensuite recrutés au télomère d'origine ayant transcrit TERRA (168). Cela mène à un modèle où la transcription de TERRA aux télomères courts permet l'accumulation de TERRA en un focus unique qui sert de noyau ("seed") permettant la nucléation de T-Recs. Ceux-ci seraient nécessaires pour concentrer l'activité de la télomérase et la diriger aux télomères courts. Ce modèle expliquerait donc comment le raccourcissement des télomères induit la formation de T-Recs et comment les télomères courts sont allongés de façon plus extensive (Fig.5).

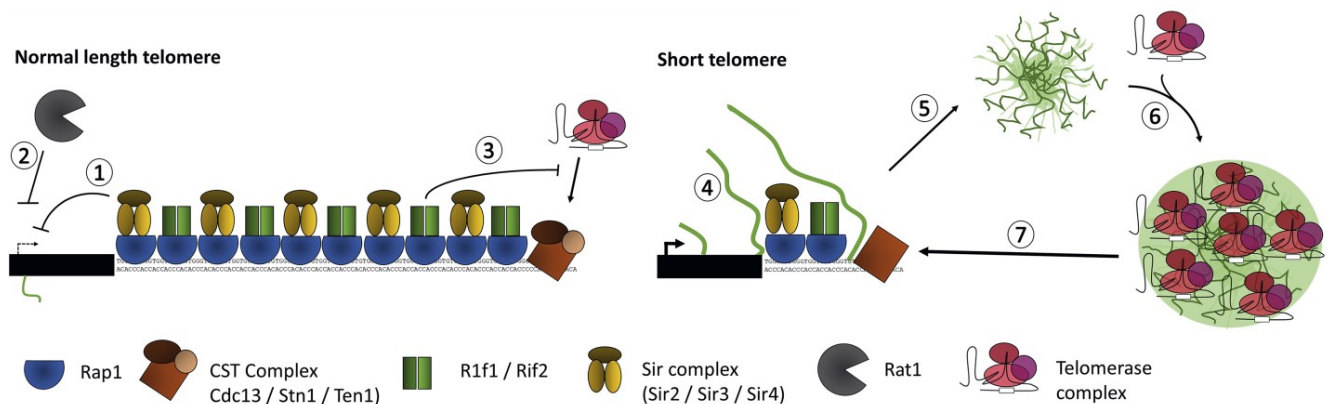


Figure 5. – La transcription de TERRA aux télomères courts induit la formation de T-Recs.

Aux télomères de taille normale (à gauche), les niveaux d'expression de TERRA sont maintenus à des niveaux bas par la répression transcriptionnelle produite le complexe SIR (1) et par la dégradation de TERRA par Rat1 (2). Le recrutement de la télomérase est aussi inhibé par des mécanismes dépendants de Rif2 (3). Aux télomères courts (à droite), l'expression de TERRA est

augmentée (4). Lorsqu'un télomère exprime TERRA, les molécules de TERRA s'accumulent en un focus unique (5) qui sert de noyau à l'agrégation de molécules de télomérase en un focus nommé T-Recs (6). Celui-ci est recruté aux télomères courts via les mécanismes de recrutement de la télomérase et dépend de l'interaction entre Cdc13 et Est1 (7). Tiré de (176) (annexe 3).

TERRA, par son rôle de concentrateur de l'activité de la télomérase, permet de mieux cibler la télomérase aux télomères et témoigne de la complexité des processus régulateurs prenant place aux télomères. D'autres mécanismes de régulation vont aussi empêcher que la télomérase puisse agir à des sites inappropriés sur le génome. Comme discuté dans les sections précédentes, les télomères ressemblent à des cassures dans l'ADN et ils sont traités par plusieurs facteurs impliqués dans la réparation de l'ADN pour favoriser l'action de la télomérase. Par contre, pour le maintien de l'intégrité génomique, il est important que les cassures dans l'ADN ne soient pas réparées par la télomérase, un phénomène appelé ajout *de novo* de télomère. Plusieurs facteurs sont donc impliqués dans l'inhibition de la réparation des dommages à l'ADN par la télomérase. Les prochaines sections porteront sur les voies de réparation de cassures dans l'ADN et sur leur rôle dans l'inhibition de l'activité de la télomérase à ces cassures.

1.5. Les dommages à l'ADN

La préservation de l'intégrité génomique est de première importance puisque le génome est soumis à plusieurs menaces provenant de sources endogènes et exogènes (181, 182). Les sources environnementales comprennent l'irradiation UV et ionisante, les infections virales, les toxines environnementales et composés génotoxiques (181-183). Les facteurs endogènes comprennent les espèces réactives de l'oxygène (ROS) formées par le métabolisme et les erreurs survenant durant les processus comme la réplication de l'ADN et la transcription. Cela peut mener à plusieurs modifications et altérations de l'ADN, menaçant ainsi l'intégrité

génomique telles que le mésappariement des bases, le pontage entre les brins de l'ADN, la production d'adduits, la formation de dimères de pyrimidine, la méthylation, hydrolyse et oxydation des bases ainsi que la production de sites abasiques (181-184). Ces dommages à l'ADN, estimés à environ 10^5 par jour, peuvent mener à une cassure d'ADN simple brin (SSB) (185). Ce type de cassure ne cause pas de risque majeur à l'intégrité du génome, mais peut évoluer en cassure d'ADN double brin (DSB). Ce dernier constitue une menace importante à la survie de la cellule et à l'intégrité du génome.

Pour ces raisons, la cellule est en constante surveillance pour identifier les dommages à l'ADN et éviter la formation de DSB. Lorsque des dommages sont détectés, plusieurs activités enzymatiques sont recrutées au site pour permettre le traitement de ce dommage, le choix de la voie de réparation et finalement réparer le dommage. Des problèmes de ségrégation des chromosomes durant la mitose peuvent aussi mener au bris d'un chromosome. La réplication du génome crée également des intermédiaires structuraux pouvant être ciblés par des nucléases (181-184). Finalement, le raccourcissement critique des télomères peut mener à leur détection comme DSB. La présence de DSBs, si non réparés, peut mener à des réarrangements chromosomiques majeurs, la sénescence ou bien l'apoptose (181, 182). La toxicité des DSBs vient aussi des risques associés à leur réparation. En effet, leur réparation peut mener à des mutations, des délétions ou des insertions et des réarrangements chromosomiques majeurs. Les différentes voies de réparations des DSBs seront abordées dans les prochaines sections.

1.5.1. Les différentes voies de réparations des dommages à l'ADN

Il existe différentes voies de réparations des dommages à l'ADN. Le choix de la voie utilisée se fait selon le type de dommage et selon le type de structure et processus cellulaires en cours autour de la cassure.

Certains dommages génomiques produisent des lésions perturbant l'hélice d'ADN et sont réparés par la voie d'excision de nucléotides (NER), une voie qui est caractérisée par

l'incision de l'ADN de part et d'autre de la lésion, l'ablation de la lésion, la synthèse d'ADN pour remplacer la séquence retirée et la ligation (186). Ces dommages comportent les dimères de pyrimidines produits par l'irradiation et par les ROS, les pontages inter-brins et certains adduits produits par des drogues génotoxiques ou des carcinogènes environnementaux (187-189). Le NER est divisée en deux sous voies, la voie de réparation globale du génome (GG-NER) et la voie couplée à la transcription (TC-NER) et dépend de la façon dont la lésion a été détecté (190-192).

Lorsque des bases d'ADN sont abîmées sans modifier la structure de l'ADN, la voie de réparation par excision de bases (BER) est utilisée pour retirer la base, et non le nucléotide, et réparer la lésion. Les types de lésions ciblées comportent la déamination et l'hydroxylation spontanée des bases d'ADN, l'oxydation des bases par les ROS produites par le métabolisme ou par différents stress environnementaux et l'alkylation par des agents carcinogènes (193, 194). Le BER procède à l'ablation de la base abîmée laissant un site abasique par une glycosylase puis au clivage du brin d'ADN au site abasique (190, 194, 195). Une polymérase remplace ensuite les nucléotides enlevés et le tout est relié.

Lorsque la machinerie de réplication fait des erreurs d'appariement ou des délétions/additions, la voie de réparation des mésappariement (MMR) est nécessaire pour corriger ces erreurs. Les erreurs sont détectées, puis un SSB est créé au site de l'erreur (190, 196, 197). Ce SSB sert de substrat pour l'exonucléase ExoI qui va dégrader l'ADN pour effacer l'erreur (190, 196, 197). La polymérase δ va ensuite remplacer la séquence dégradée et le tout est attaché (190, 196, 197).

Le métabolisme, les carcinogènes environnementaux et certaines drogues peuvent causer la méthylation des guanines et thymines de l'ADN. Ceux-ci sont retirés par la voie de réparation directe qui catalyse le transfert d'un groupement méthyl (198).

1.5.2. Les différentes voies de réparation des DSBs

Lorsqu'une cassure d'ADN double brin se produit, différentes voies de réparation peuvent être mise à contribution pour réparer cette cassure. Le choix de la voie à privilégier dépend du type d'extrémité, de la quantité d'ADN simple brin, de la présence d'une séquence homologue et du cycle cellulaire. Les voies de réparations sont séparées en 2 catégories : les voies de jonction des extrémités et les voies de recombinaison. Les voies de jonction n'ont besoin d'aucune séquence homologue comme modèle pour la réparation et peuvent donc avoir lieu durant n'importe quelle phase du cycle cellulaire. Les voies de recombinaison utilisent principalement la chromatide sœur comme modèle pour effectuer la réparation et ce type de réparation est restreint aux phases S et G2 du cycle cellulaire. Les voies de recombinaison nécessitent aussi la résection des extrémités pour fournir un long brin d'ADN simple brin afin de pouvoir effectuer la recombinaison. À l'inverse, la présence de longs brins d'ADN simple brin inhibe les processus de jonction. Le recrutement du complexe γ KU (γ Ku70/ γ Ku80) aux sites de dommage inhibe la résection en phase G1 pour favoriser la réparation par jonction des extrémités (199, 200). En phase S, l'activation des kinases dépendantes des cyclines (CDKs) a l'effet inverse et active la résection (199, 201). Un dernier point pouvant influencer le choix de catégorie de voie de réparation est si le site de cassure est « propre » ou encombré. En effet, la machinerie des voies par jonction est mal équipée pour réparer des extrémités encombrées par des nucléotides abimés, modifiés, pontés ou possédant des adduits protéiques (202-204). Ce type d'extrémité nécessite le complexe MRX et favorise donc la réparation par recombinaison (116, 117). Ces deux catégories se divisent aussi en différentes sous-voies dépendamment de la présence d'homologies de séquences proche du site de cassure et des différents intermédiaires de réparation formés.

1.5.2.1. La réparation par ligation des extrémités non-homologues classique (c-NHEJ)

En phase G1, l'absence de chromatide sœur rend les méthodes de recombinaison dangereuses. En effet, effectuer une recombinaison sans chromatide sœur, en utilisant des séquences partiellement homologues, augmente les risques de mutation et de recombinaison erronée pouvant mener à de l'instabilité génomique. Pour cette raison, la majorité des DSBs en G1 sont réparées par c-NHEJ qui consiste en la ligation de deux extrémités d'ADN franches. Cette voie, en l'absence de multiples DSBs, génère peu de risque pour la cellule. Mais la présence de multiples extrémités d'ADN peut mener en une ligation aberrante et à des réarrangements majeurs tels que des chromosomes dicentriques ou sans centrosome. Les étapes du c-NHEJ consistent en la liaison du complexe γ Ku aux extrémités d'ADN, le rapprochement des extrémités et leur ligation.

Le complexe γ Ku est central pour le c-NHEJ. Il interagit de façon non-spécifique avec les extrémités d'ADN (205). Une fois recrutés à un DSB, sa présence inhibe la résection, dirigeant ainsi la réparation vers la ligation des extrémités (199, 200). Ensuite le complexe de ligation Dnl4/Lif1/Nej1 procède à la ligation des deux extrémités (183, 206). Le complexe MRX est aussi impliqué dans le c-NHEJ, bien que son rôle ne soit pas clair. Il serait impliqué dans le rapprochement des extrémités d'ADN pour permettre leur ligation et pourrait jouer un rôle dans le traitement des extrémités si celles-ci ne sont pas totalement franches (118) (Fig.6).

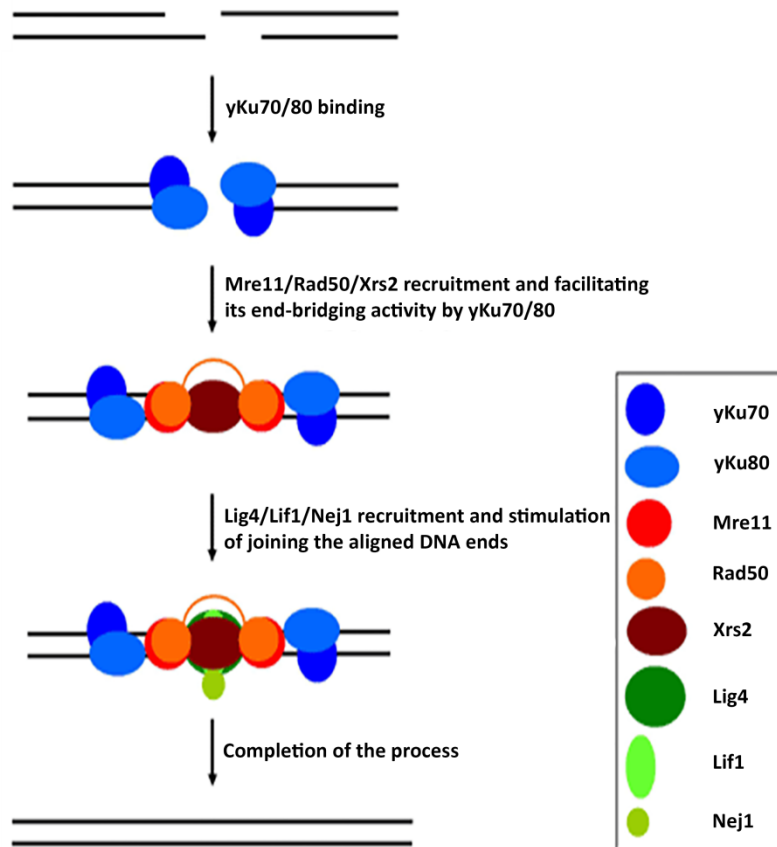


Figure 6. – Principales étapes des voies de réparation par ligation des extrémités non-homologues (NHEJ).

En présence d'un DSB, les voies de réparation par ligation des extrémités peuvent être mises à profit pour la réparation. La voie de réparation par ligation des extrémités non-homologues classique (c-NHEJ) nécessite une extrémité franche. Le recrutement du complexe yKu protège les extrémités et le complexe MRX aide à maintenir les extrémités à proximité. En présence d'une courte séquence d'ADN simple brin, le complexe MRX ou des polymérases peuvent procéder au traitement des extrémités. Le complexe de ligation Lig4/Lif1/Nej1 procède ensuite à la ligation de la cassure. Modifiée à partir de (207).

1.5.2.2. La réparation par ligation des extrémités non-homologues alternative (alt-NHEJ)

La c-NHEJ nécessite des extrémités franches ou une extrémité simple brin de moins de 4 nucléotides (208). Une méthode alternative met à profit une résection à courte distance de la cassure pour trouver des séquences homologues (4 à 20 nucléotides) de part et d'autre de la cassure pour sa réparation (209, 210). Cette voie de réparation est nommée alt-NHEJ ou voie de réparation par jonction des extrémités médiée par micro-homologie (MMEJ). Elle est souvent considérée comme une voie intermédiaire entre la NHEJ et la recombinaison homologue (HR). Ses étapes comprennent la résection des extrémités par le complexe MRX et la nucléase Sae2 pour découvrir des séquences homologues. Il est toutefois à noter que plus long est brin d'ADN simple brin créé, plus le choix de la voie de réparation penche en faveur de la recombinaison homologue (211, 212). Suivant la résection, si de courtes séquences homologues ont été découvertes, celles-ci peuvent s'hybrider entre elles et permettre la réparation (213, 214). Cette voie de réparation est considérée comme mutagène et génère le plus d'instabilité génomique car elle entraîne la délétion de la séquence entre les régions d'homologie ainsi que d'une des deux séquences homologues utilisée pour la réparation.

1.5.2.3. La réparation par recombinaison homologue (HR)

Une des voies les plus importantes de réparation chez la levure est la réparation par recombinaison homologue ou HR. Elle intervient à un moment important du cycle cellulaire, la réplication du génome. Elle prend place durant les phases S/G2. Cette phase est accompagnée de plusieurs sources de stress génomiques et de sources potentielles de DSBs. La HR est aussi la voie de réparation la plus fidèle. En effet, ayant lieu durant les phases S/G2, elle met à contribution le fait qu'elle possède une copie parfaite de la séquence à réparer tenue en proximité par le complexe de la cohésine (215).

Elle est également la voie la plus complexe et impliquant le plus d'étapes. Premièrement, chaque côté du DSB est sujet à une résection extensive de plusieurs kilobases (216). La résection à courte portée du brin 5' met à profit les activités d'endonucléase et d'exonucléase 3'-5' du complexe MRX, aidée de Sae2 (217, 218). Ces activités sont importantes pour retirer les nucléotides abîmés, adduits et protéines présentes au site de cassure (116, 117). Sae2 est phosphorylée par des CDKs et ces modifications post-traductionnelles sont nécessaires pour l'activation de l'activité d'endonucléase du complexe MRX (201). Cette étape limite la résection des DSBs aux phases S/G2 du cycle cellulaire (201). Ensuite, la résection à courte portée permet de créer un site d'entrée pour les exonucléases 5'-3' Exo1 et Dna1 responsables de la résection à longue portée (216, 219). La résection extensive crée un long ADN simple brin pour permettre l'envahissement de la chromatide sœur afin de trouver une séquence homologue permettant de réparer la cassure. Au fur et à mesure de la résection, le simple brin est recouvert par le complexe RPA. Celui-ci est un composé de Rfa1, Rfa2 et Rfa3. Par sa liaison à l'ADN simple brin, il protège celui-ci des nucléases, retire les structures secondaires, sert d'intermédiaire de signalisation et permet le recrutement de protéines de réparation (220-223) (Fig.7).

L'étape suivante de la HR est la création du filament présynaptique, qui est nécessaire pour l'envahissement de la chromatide sœur par l'ADN simple brin (224). La formation du filament présynaptique nécessite le remplacement de RPA sur l'ADN simple brin par la recombinaise Rad51 et permet l'envahissement par celui-ci de l'ADN double brin homologue de la chromatide sœur, formant une structure nommée boucle D (D-loop) où l'ADN simple brin de la cassure s'apparie avec le brin complémentaire de la chromatide sœur (224). Par contre, RPA possède une plus grande affinité pour l'ADN simple brin que Rad51 (225). Pour procéder au remplacement de RPA par Rad51 sur l'ADN simple brin, la protéine médiatrice Rad52 est nécessaire puisque Rad52 interagit avec Rad51 et RPA et facilite le remplacement (225-227). L'utilisation de rideaux d'ADN simple brin a permis de mieux caractériser ces transactions (228, 229). En l'absence de Rad52, RPA se lie à l'ADN simple brin mais cette association est instable et RPA se dissocie rapidement de l'ADN simple brin (229). Lorsque Rad52 se lie à RPA, cela stabilise la liaison de RPA avec l'ADN simple brin et empêche sa dissociation (228). Cette stabilisation de RPA empêche la liaison à l'ADN simple brin de protéines non-impliquées dans la recombinaison

homologue. Rad52 se propage le long du brin d'ADN recouvert par RPA, stabilisant RPA tout au long de la fibre (228). La présence de Rad52 permet le remplacement ciblé de RPA par Rad51 sur l'ADN simple brin (228). Par contre, certains sites sur la fibre d'ADN simple brin maintiennent l'interaction avec RPA-Rad52 (228). Ces sites servent au recrutement de nouvelles molécules de Rad52 et de RPA par des interactions protéine-protéine (228). Il est suggéré que le deuxième recrutement de ces protéines permet de localiser Rad52 et RPA pour leur rôle dans la boucle D et la capture de la deuxième extrémité (228) (Fig.8).

Après le remplacement de RPA par Rad51, Rad51 et Rad52 sont responsables de la recherche d'une séquence homologue chez la chromatide sœur. Ce processus se fait par de multiples contacts avec l'ADN à proximité jusqu'à ce qu'une séquence homologue soit trouvée. La recherche est facilitée par le fait que la chromatide sœur est tenue à proximité par la cohésine, par une mobilité accrue du brin recouvert par Rad51 et par la localisation des DSB à la membrane nucléaire (230-233). Lorsque qu'une séquence homologue est identifiée, Rad51 catalyse l'ouverture de l'ADN double brin de la chromatide sœur et la formation d'un hétéroduplexe entre l'ADN simple brin de la cassure et le brin complémentaire de la chromatide sœur (234). (Fig.7)

La formation de l'hétéroduplexe est aidée par l'action de plusieurs protéines. Rad52, en plus de jouer un rôle dans le remplacement de RPA par Rad51, permet d'accélérer l'hybridation entre les deux brins homologues (227). Rad55 et Rad57 forment un dimère qui stimule l'étape d'envahissement de la chromatide sœur par l'ADN simple brin recouvert par Rad51 (235). Rad54 interagit avec Rad51 et joue un rôle de remodelage de la chromatine pour permettre l'envahissement de l'ADN duplex (236-238). RPA va lier le brin déplacé par l'envahissement pour le protéger. Dans le cas d'intermédiaire de réparation erroné ou délétère, l'hélicase Srs2 inhibe l'envahissement de l'ADN duplex et retire Rad51 de l'ADN simple brin (239, 240). Cette activité de Srs2 est contrôlée par sa phosphorylation et SUMOylation (Fig.7).

Suivant la formation de la boucle D, l'extrémité 3' de l'ADN simple brin appariée dans la boucle D va servir d'amorce pour les polymérases répliquatives afin de permettre la réparation. En même temps, l'extrémité 3' de la deuxième extrémité créé par le DSB va s'apparier au brin

déplacé de la chromatide sœur dans la boucle D et va aussi servir d'amorce aux polymérases. Cette capture de l'autre brin par la boucle D se fait grâce à Rad52 (241). La polymérisation se fait pour toute la longueur de la séquence simple brin créé par la résection et est suivie par la ligation des extrémités, reconstituant ainsi le chromosome. Les étapes de polymérisation et de ligation entraînent la formation d'une double jonction de Holliday (242). Celles-ci sont résolues à l'aide de topoisomérases ou de nucléases spécifiques pour empêcher des problèmes de ségrégation des chromosomes (243) (Fig.7).

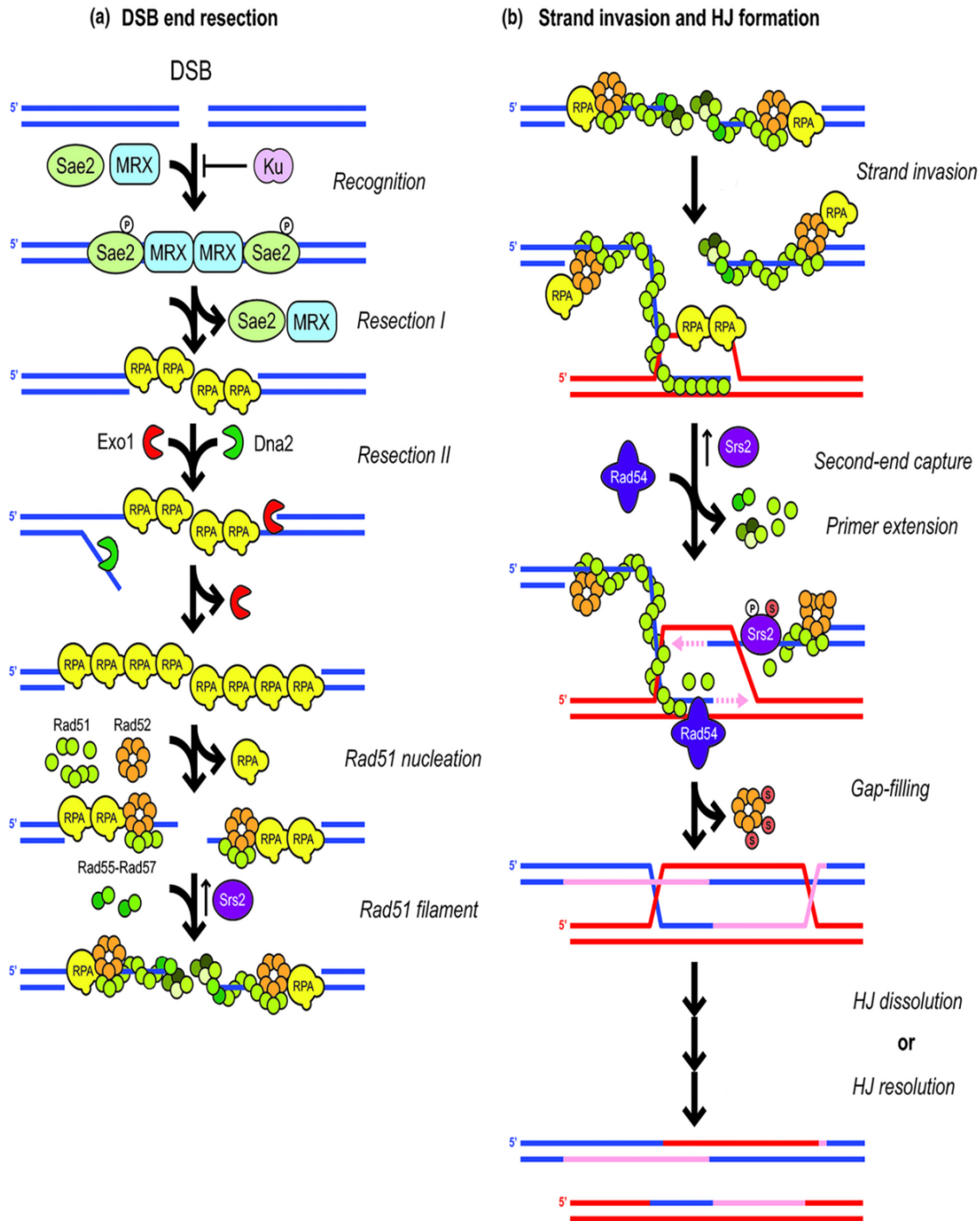


Figure 7. – Principales étapes des voies de réparation par recombinaison.

En présence d'une cassure d'ADN double brin (DSB), la voie de réparation par recombinaison homologue peut être mise à profit pour la réparation. **(a)** Celle-ci est entamée par la détection de la cassure par le complexe MRX. En phase G1, le complexe yKu inhibe la résection des

extrémités. En phases S/G2, Sae2 est activée par phosphorylation et active le complexe MRX. Ensemble, ils procèdent à la résection à courte portée. L'ADN simple brin découvert est recouvert de RPA. La première résection permet de créer un site d'entrée aux nucléases à longue portée Exo1 et Dna2. Ensuite, Rad52 procède au remplacement de RPA par Rad51. Dans le cas d'assemblage erroné, Srs2 peut retirer Rad51 de l'ADN simple brin. Rad55 et Rad57 stimulent les étapes subséquentes d'envahissement de la chromatide sœur. **(b)** Après la formation du filament recouvert de Rad51, celui-ci va envahir la chromatide sœur et former une boucle D en s'hybridant avec sa séquence homologue. Rad54 aide à reconfigurer la chromatide pour aider à ce processus. Le brin déplacé est protégé par la liaison de RPA et permet la capture de l'autre extrémité de la cassure. Srs2 peut déstabiliser la boucle D dans le cas d'envahissement erroné. Son activité est régulée par l'équilibre entre sa phosphorylation et sa SUMOylation. L'action d'ADN polymérases remplace les séquences manquantes ce qui forme une double jonction de Holliday qui lorsque résolue, complète la réparation. La SUMOylation de Rad52 provoque son relâchement de la chromatine en diminuant son affinité à l'ADN. Modifié à partir de (244).

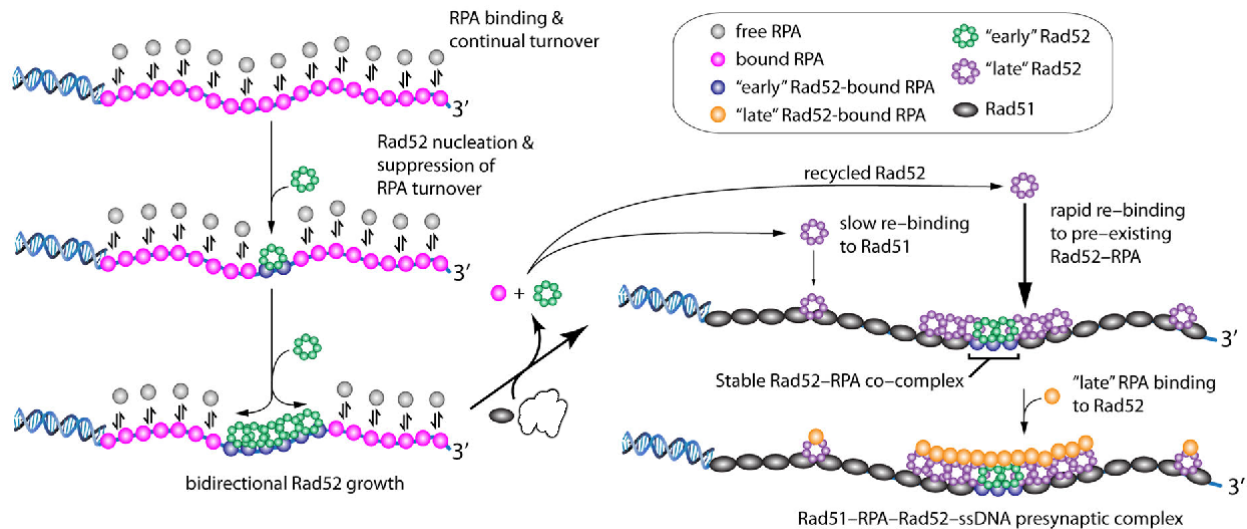


Figure 8. — Transactions sur l'ADN simple brin entre RPA, Rad51 et Rad52.

La résection d'une cassure d'ADN découvre une longue portion d'ADN simple brin, qui recouvert par RPA. La liaison entre RPA et l'ADN simple brin est instable et RPA s'y associe et dissocie constamment. La liaison de Rad52 stabilise la liaison de RPA avec l'ADN simple brin et Rad52 se propage le long de la fibre. Rad52 procède au remplacement de RPA par Rad51. Par contre, certains sites maintiennent l'interaction avec RPA-Rad52. Ces sites servent de sites de nucléation pour le recrutement d'autres molécules de Rad52 et RPA par des interactions protéine-protéine. Rad52 peut aussi être recruté à l'extérieur de ces sites de nucléation. Le recrutement de Rad52-RPA sur le filament présynaptique permet de localiser Rad52 dans la boucle D pour promouvoir son rôle stabilisateur de la boucle D et son rôle dans la capture de la deuxième extrémité. Elle localise également RPA à proximité du brin déplacé de la boucle D ce qui favoriserait la protection de celui-ci par RPA. Tiré de (228).

1.5.3. La réponse aux dommages à l'ADN

La présence d'un dommage à l'ADN ainsi que sa réparation nécessite la coordination de plusieurs machineries. La cellule doit en effet procéder à la détection rapide du dommage, précéder à son traitement, décider du choix de voie de réparation, recruter les protéines utiles

au site et décider de son sort. Ces choix peuvent mener à l'arrêt du cycle cellulaire afin de réparer le dommage, à l'entrée en sénescence, à l'apoptose ou bien à la poursuite du cycle cellulaire malgré le dommage (245, 246). À l'origine de cette coordination et de cette prise de décision se trouve les protéines de la réponse aux dommages à l'ADN (DDR) (247). Cette réponse commence par la détection du dommage et le recrutement de Tel1 et Mec1, homologues des kinases ATM et ATR, respectivement. Tel1 est recruté aux DSBs via son interaction avec la protéine Xrs2 du complexe MRX, qui joue un rôle de senseur de dommage à l'ADN (248). Le recrutement de Mec1, quant à lui, dépend de la présence d'ADN simple brin recouvert de RPA et de son interaction avec son partenaire Ddc2 (249-251). Mec1 est donc recrutée à une plus grande variété de lésions menant à la formation d'ADN simple brin. D'autres protéines servent de senseurs de dommage à l'ADN et aide à l'activation de Mec1 aux sites de dommages, tels que le complexe Rad17/Mec3/Ddc1 et le chargeur du complexe 9-1-1 Rad24 (252-254). Cette différence de signaux de recrutement des kinases permet aussi une alternance entre la signalisation par Tel1 et par Mec1 (248, 255).

L'interaction de Tel1 avec Xrs2 active l'activité kinase de Tel1. Cette interaction active également l'activité du complexe MRX (26, 256). Le recrutement de Tel1 aide donc au traitement des extrémités par le complexe MRX et inhibe le NHEJ en inhibant la localisation du complexe γ Ku aux DSBs (257). Tel1 et Mec1 vont aussi entamer une cascade de phosphorylation entraînant la formation d'une plateforme de recrutement et de signalisation menant à l'activation de Rad53 et Chk1 (255, 258-266). Cette cascade commence par la phosphorylation du variant d'histone H2AX par Tel1 qui servira de plateforme de recrutement pour Mrc1 et pour Rad9 (258). Mrc1 va favoriser l'interaction entre Tel1 et le complexe MRX en plus d'augmenter l'activité de Tel1 (259). Rad9, quant à lui, est déjà présent sur la chromatine dû à son interaction avec les histones H3 méthylées sur leur lysine 79 (H3K79me) (267). Cependant, son enrichissement aux DSBs est permis grâce à son interaction avec le variant d'histone H2AX phosphorylé (γ H2AX) (258, 260). Sa présence permet de contrôler la résection par l'inhibition de Sae2 (261, 262). Donc, le recrutement de Tel1 permet, dans un premier temps, de favoriser la résection puis, par son activité kinase, de réguler cette résection. Aussi, comme mentionné plus tôt, la résection promut par Tel1 entraîne le recrutement de RPA et sert donc de signal pour le

recrutement de Mec1 (255). Celle-ci, une fois recrutée, continue de phosphoryler les histones H2AX et va aussi phosphoryler Rad9 et la kinase Chk1 (258, 263). Rad9 servira ainsi de plateforme de recrutement pour la kinase Rad53 (263, 264). L'interaction de Rad53 avec Rad9 phosphorylé active son activité d'autophosphorylation la rendant totalement active (265). Mec1 et Tel1 participent aussi à sa phosphorylation (265). Rad53 joue un rôle de contrôle de la résection en phosphorylant Exo1 ce qui inhibe son activité (266). L'activation de Rad53 et de Chk1 est responsable de la phosphorylation de la majeure partie des effecteurs de la réponse aux dommages à l'ADN et vont mener à des changements globaux dans la cellule. Ceux-ci seront couverts plus loin.

1.5.3.1. L'implication de la SUMOylation dans la réponse aux dommages à l'ADN

Comme mentionné précédemment, la réponse aux dommages à l'ADN implique la coordination de plusieurs facteurs et processus cellulaires. À la base de cette coordination se trouve un réseau complexe de modifications post-traductionnelles (PTMs), la plus commune étant la phosphorylation. Le réseau de PTMS est toutefois plus complexe et implique entre autres l'ubiquitination et la SUMOylation (268). De plus, les PTMs montrent plusieurs interactions entre elles. Par exemple, la phosphorylation d'une protéine peut mener à sa dégradation via son ubiquitination ou bien, à l'inverse, empêcher son ubiquitination (268). D'autres PTMs induites par les dommages à l'ADN comprennent l'acétylation, la méthylation et la NEDDylation (268). Celles-ci régulent les interactions et le recrutement de protéines au site de dommage (268).

L'ubiquitination, qui consiste en la liaison covalente d'une protéine, l'ubiquitine, sur la lysine d'une autre protéine, implique trois enzymes : E1, E2 et E3 ligases (269). L'enzyme E3 est celle fournissant la spécificité de substrat (269). De plus, l'ubiquitination d'une protéine peut mener à différents résultats dépendamment du type de conjugaison. La polyubiquitination en chaîne d'une lysine mène habituellement à la dégradation de la protéine par le protéasome

(270). La monoubiquitination sert plutôt de plateforme de signalisation et régule les interactions protéine-protéine (270).

La SUMOylation nécessite aussi trois enzymes : E1, E2 et E3 SUMO ligase. Seulement quatre E3-SUMO ligases existent chez la levure : Siz1, Siz2, Mms21 (faisant parti du complexe Smc5/Smc6) et Cst9 (spécifique à la méiose) (271, 272). La SUMOylation peut prendre différentes architectures de façon similaire à l'ubiquitination (273). Par contre, la SUMOylation en chaîne ne mène pas à la dégradation par le protéasome mais sert de plateforme de signalisation (273). La SUMOylation apparaît comme une des modifications les plus importantes dans la DDR chez la levure. Suite au dommage à l'ADN, une cascade de SUMOylation à grande échelle au site de dommage prend place (274). Une des fonctions de cette vague de SUMOylation est de servir de « colle », permettant de renforcer les interactions existantes et de favoriser la formation de complexes (274). Une autre façon dont la SUMOylation joue son rôle est par son interaction avec l'ubiquitination. En effet, plusieurs sites de SUMOylation sont aussi des sites d'ubiquitination, permettant ainsi une compétition entre les deux PTMs. Aussi, certaines ubiquitine ligases (STUbls) ciblent les protéines SUMOylées. Celles-ci, peuvent servir à masquer la PTM précédente ou bien cibler les protéines SUMOylées pour la dégradation (275, 276).

La SUMOylation est impliquée dans la régulation des voies de réparation BER, NER, HR et NHEJ en plus de jouer un rôle au niveau de la régulation de la réparation post-réplication (277-279). La SUMOylation influence le NHEJ en modifiant les protéines γ Ku et Lif1. Leur SUMOylation a par contre des effets inverses, augmentant l'affinité à l'ADN du complexe γ Ku mais réduisant celle de Lif1 (280, 281). La plupart des protéines de la HR sont SUMOylées y compris le complexe RPA, le complexe MRX, Rad52, Rad59, Srs2 et Sae2 (282, 283). La protéine Rad52 est au centre de la HR et est régulée de façon extensive par Siz2 (284). La SUMOylation de Rad52 par Siz2 se fait sur plusieurs résidus qui participent tous aux effets régulateurs de Rad52 (285). L'activité de Siz2 diminue l'affinité générale de Rad52 pour l'ADN simple brin et double brin (285). Elle a aussi pour effet de favoriser l'interaction de Rad52 avec Rad51, favorisant ainsi la recombinaison (286). Pour empêcher des événements non-nécessaires de recombinaison, la SUMOylation de Rad52 est aussi importante pour déloger le complexe Rad51-

Rad52 de l'ADN (286). La modification de Rad52 est aussi la cible de STUBls permettant de réguler Rad52 et la recombinaison par sa dégradation par le protéasome (287). Cette interaction entre les deux PTMs est importante pour inhiber la localisation de Rad52 dans le nucléole et aux séquences répétées (288, 289). Cette exclusion nucléolaire de Rad52 permise par la SUMOylation est importante pour empêcher des événements erronés de recombinaison entre les répétitions ou dans l'ADN ribosomal. La réparation des cassures d'ADN par la recombinaison homologue ne se fait que dans le nucléoplasme et les cassures d'ADN dans les répétitions ribosomales doivent se relocaliser à la périphérie du nucléole pour être réparées (289, 290).

Un autre rôle important de la SUMOylation et de son interaction avec les STUBls (spécifiquement Slx5-Slx8) est la localisation des DSBs non réparables à la membrane nucléaire. Celle-ci joue un rôle dans le choix de la voie de réparation (232). L'activité en phase S/G2 de mono-SUMOylation de Mms21 localise les DSBs à la membrane nucléaire (291). Cette localisation inhibe la HR et promeut des réarrangements chromosomiques grossiers (GCRs, voir section ci-dessous) (291). En opposition, la poly-SUMOylation par Mms21 et Siz2 aux sites de dommages recrute les STUBls et induit la localisation aux pores nucléaires et la poly-ubiquitination des cibles des STUBls, favorisant le BIR ou la ligation d'extrémités pour réparer les DSBs (291).

1.5.3.2. Les effecteurs de la réponse aux dommages à l'ADN

Les effecteurs activés par la DDR permettent de coordonner le statut de la cellule aux processus de réparation. Cela comprend entre autre un contrôle transcriptionnel, une augmentation de la production de nucléotides, une inhibition des origines de réplication tardives, une localisation des dommages à l'ADN à la membrane nucléaire, la concentration des protéines de réparation aux sites cassure et une inhibition de la progression du cycle cellulaire (245, 246). Parmi les effecteurs importants se trouve Sml1 dont la phosphorylation induit sa dégradation (292). Sml1 est un inhibiteur de la ribonucléotide réductase et sa dégradation

permet l'augmentation de la production de nucléotides (293). La phosphorylation par les kinases Rad53 et Chk1 induit également une inhibition de la transcription des cyclines (247, 294). Cette inhibition permet d'empêcher l'activation de Cdc28 et ainsi arrêter le cycle cellulaire pour procéder à la réparation (247, 294, 295). De plus, Chk1 phosphoryle la sécurine, inhibant l'entrée en anaphase et maintenant les chromatides sœurs à proximité par la cohésine pour favoriser la recombinaison homologue entre chromatides sœurs (296-299). Les mécanismes par lesquels la cohésine maintient les chromatides sœurs à proximité seront couverts dans la section suivante.

1.6. La cohésion des chromatides sœurs

Les chromatides sœurs sont maintenus ensemble à partir de la réplication du génome jusqu'à l'anaphase (300). La cohésion est importante pour la ségrégation adéquate des chromosomes durant la mitose (300). Le complexe responsable de la cohésion est la cohésine. Celle-ci joue aussi un rôle dans la compaction de l'ADN, l'organisation du génome, la formation de domaines associés de façon topologique (TAD), la régulation de l'expression génique et dans la réparation des dommages à l'ADN (300). La cohésine est un complexe faisant partie de la famille des complexes de maintenance structurelle (SMC). Ces complexes adoptent une structure en forme d'anneau et participent à l'organisation structurelle du génome (301). Cette famille contient le complexe de la cohésine, la condensine et le complexe Smc5-Smc6 (301). La condensine permet la compaction des chromosomes par la formation de boucles d'ADN (301, 302). Le complexe Smc5-Smc6 assiste la réplication de l'ADN au niveau des fourches de réplication et assiste la réparation des cassures de l'ADN (301, 303).

1.6.1. La cohésine

La cohésine est un complexe composé des protéines Smc1, Smc3, Mcd1/Sccl/Rad21 et Sccl/Irr1 (300). Les protéines accessoires Wpl1/Rad61, Pds5, Sccl et Sccl régulent les fonctions de la cohésine (300, 304). La cohésine fonctionne en formant un anneau et en emprisonnant deux brins d'ADN à l'intérieur de l'anneau (300, 304-306). Pour son rôle dans la cohésion entre chromatides, ces deux brins sont deux chromatides sœurs tandis que pour la formation de TAD et pour la compaction du génome, ces deux brins sont deux régions différentes de la même chromatide. Un autre modèle existe où un complexe emprisonne un seul brin d'ADN et la cohésion est établie par l'interaction entre deux complexes cohésine (300, 304, 307).

Les protéines Smc1 et Smc3 forment un hétérodimère en forme de « V ». Les deux protéines se replient sur elles-mêmes sous forme de bobine enroulée ("coiled coil domain") et interagissent ensemble par un domaine charnière central ("hinge domain") (300, 301, 304). Leurs domaines C-terminal et N-terminal se replient ensemble et forment des domaines globulaires ATPase (300, 301, 304). Les domaines ATPase des protéines Smc1 et Smc3 sont reliées par la protéine Mcd1 et ces interactions ferment l'anneau de la cohésine (300, 301, 304). La protéine Sccl interagit avec Mcd1 et leur interaction forme une interface importante pour la liaison du complexe avec l'ADN et l'enrichissement de la cohésine sur les chromosomes (308) (Fig.9).

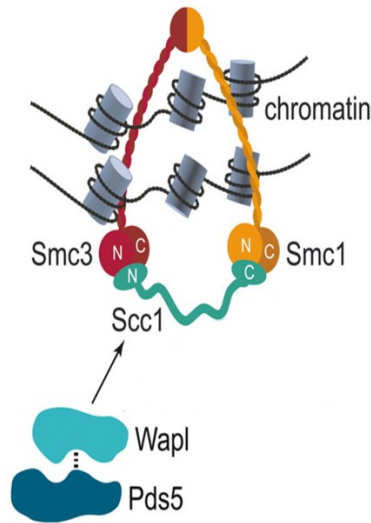


Figure 9. – Composition de la cohésine.

La cohésine est composée de trois sous-unités principales qui forment un anneau pouvant emprisonner deux chromatides. Les protéines Smc1 et Smc3 interagissent ensemble par leur domaine central charnière et forment une structure de bobine enroulée qui permet de joindre l'extrémité C-terminale avec l'extrémité N-terminale pour former un domaine ATPase. La protéine Scc1/Mcd1/Rad21 interagit avec les domaines ATPase de Smc1 et Smc3, fermant l'anneau. La protéine Scc3/Irr1 interagit avec Scc1/Mcd1/Rad21 et participe au chargement de la cohésine sur l'ADN. La liaison des protéines Wpl1/Rad61 et Pds5 déstabilise l'interface Smc3-Scc1/Mcd1/Rad21 et ouvre l'anneau, permettant la relâche des chromatides. Tiré de (304).

1.6.2. L'établissement et la régulation de la cohésion

Chez *S. cerevisiae*, la cohésine est chargée sur la chromatine en fin de phase G1, juste avant la réplication de l'ADN (309-312). Le complexe de chargement, constitué des protéines Scc2 et Scc4, interagit avec la cohésine et avec l'ADN et est responsable de charger la cohésine sur les chromosomes (313-315). Bien qu'il n'y ait pas de motifs d'ADN particulier établissant les sites de liaison de la cohésine, celle-ci est enrichie aux régions péri-centromériques et à certains sites riches en nucléotides AT espacés d'environ 10 kb le long des bras des chromosomes (316-

321). L'enrichissement de la cohésine est établi partiellement par les sites de chargement par Scc2-Scc4. En effet, les sites d'enrichissement du complexe Scc2-Scc4 chevauchent partiellement les sites d'enrichissement de la cohésine (315, 319). Par contre, une fois chargée, la cohésine peut « glisser » sur la chromatine (322, 323). Il a été montré que la transcription peut déplacer la cohésine ce qui explique l'enrichissement de la cohésine à des sites de transcription convergente (322, 324, 325). Chez l'humain, la protéine CTCF interagit avec la cohésine et limite le déplacement de la cohésine le long des chromosomes (317, 326). Elle établit aussi des limites lors de la formation de boucle génomique par la cohésine en plus d'établir des frontières pour la propagation de l'hétérochromatine (327-331) (Fig.10).

Les mécanismes de chargement de la cohésine sur le chromosome impliquent l'ouverture de la cohésine au niveau de l'interface Smc1-Smc3 (332-335). Cette ouverture nécessite la liaison à l'ATP des domaines ATPase de Smc1 et Smc3 (336-339). La cohésine peut aussi interagir avec l'ADN de façon topologique sans emprisonner le brin d'ADN dans l'anneau (333) (Fig.10).

La cohésine peut s'associer de façon réversible avec les chromosomes avant l'engagement de la réplication. La réversibilité de cette association est due à la déstabilisation de l'interface Smc3-Mcd1 par les protéines accessoires Wpl1 et Pds5 (340-346) (Fig.9). Ceci mène à l'ouverture de la cohésine et au relâchement de la chromatine. Ce mécanisme permet de réguler l'établissement de la cohésion. Lors de la réplication de l'ADN, le domaine ATPase de Smc3 est acétylé par l'acétyl-transférase Eco1/Ctf7 (346-350). Eco1 est retrouvé au niveau de la membrane nucléaire et voyage également avec la fourche de réplication (351-353). Eco1 permet d'acétyler Smc3 sur les lysines K112 et K113 au moment de la réplication de l'ADN (354, 355). L'acétylation de ces résidus interfère avec l'interaction entre Wpl1-Pds5 et la cohésine et stabilise l'interaction entre Smc3 et Mcd1, ce qui permet le maintien de la cohésion entre les chromatides sœurs à partir de la réplication jusqu'à l'anaphase (346-350). En effet, la délétion de *ECO1* est non-viable, prouvant son importance dans les mécanismes d'établissement de la cohésion (356). Par contre, le sauvetage de ce phénotype est possible par la co-délétion de Wpl1 ou de Pds5, suggérant l'opposition de fonction entre Eco1 et Wpl1-Pds5 (354, 356) (Fig.10).

Durant l'anaphase, les chromatides sœurs sont relâchées de la cohésine pour permettre la ségrégation subséquente des chromosomes. Le relâchement ne passe ni par l'interface Smc1-Smc3 ni par l'interface Smc3-Mcd1 mais implique le clivage de Mcd1 par la séparase (357). La séparase est une protéase à cystéines qui est inactivée à l'extérieur de l'anaphase par sa liaison avec la sécurine (357). Par contre, à l'entrée en anaphase, le complexe promoteur de l'anaphase (APC) est activé ce qui mène à l'ubiquitination et la dégradation de ses substrats, dont la sécurine (358). En présence de dommages à l'ADN, la sécurine est phosphorylée par Cdk1 ce qui la stabilise et empêche sa dégradation (296). La dégradation de la sécurine permet à la séparase de cliver Mcd1 et, par conséquent, le relâchement des chromatides sœurs. La kinase Cdc5, essentielle à la progression de l'anaphase, phosphoryle Mcd1 ce qui favorise son clivage par la séparase (359). Suite au clivage de Mcd1, Smc3 est déacétylé par la déacétylase Hos1 pour permettre le recyclage de l'hétérodimère Smc1-Smc3 pour le prochain cycle cellulaire (360). De plus, l'expression de Mcd1 est régulée en fonction du cycle cellulaire et atteint son maximum durant la phase S pour assurer la formation de nouveaux complexes cohésine (312, 361) (Fig.10).

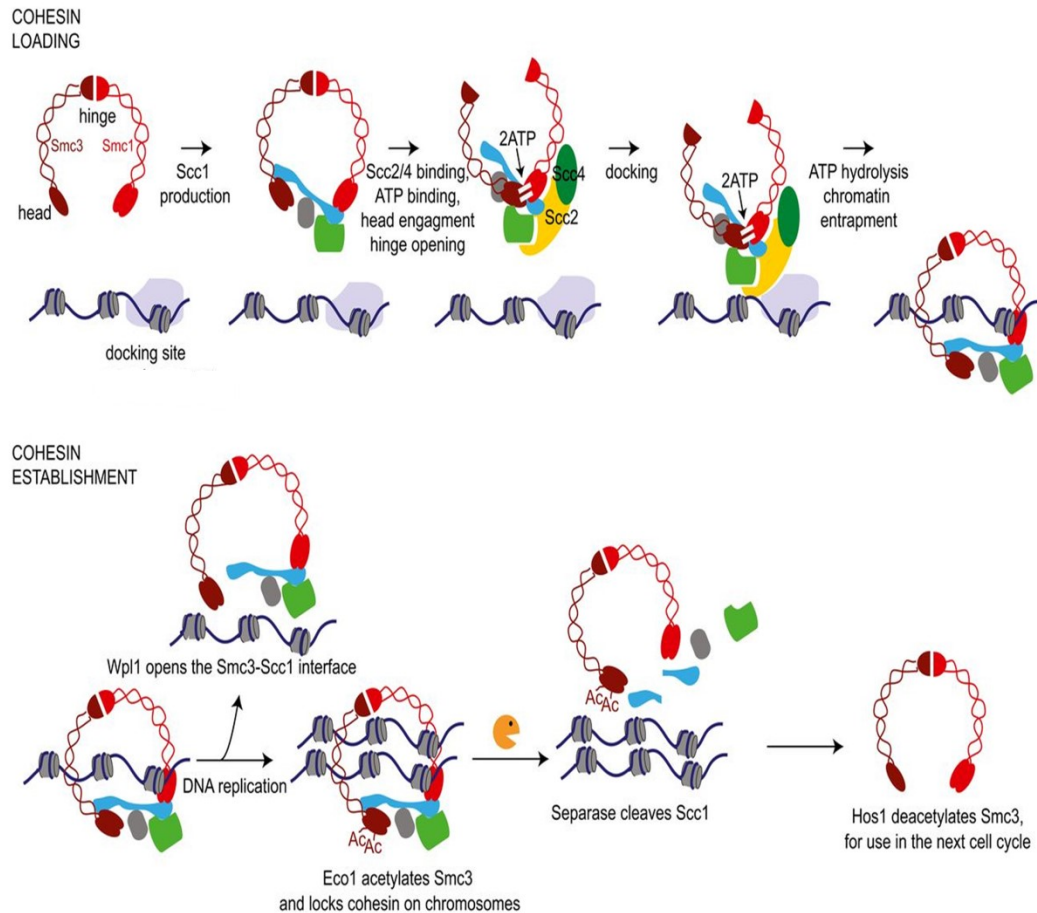


Figure 10. – L'établissement de la cohésion.

La production en phase S de la sous-unité Scc1/Mcd1/Rad21 permet l'assemblage de la cohésine. Celle-ci peut être chargée sur un chromosome en G1 par le complexe de chargement Scc2-Scc4, aidé par la sous-unité Scc3/Irr1 (carré vert). La liaison à l'ATP par Smc3 et Smc1 permet l'ouverture du domaine charnière et l'emprisonnement du chromosome au centre de l'anneau de la cohésine. L'interaction de Wpl1/Rad61 avec la cohésine, aidé par Pds5 (en gris) déstabilise l'interface Smc3-Scc1/Mcd1/Rad21, ce qui relâche le chromosome de la cohésine. Durant la réplication du génome, l'acétylation de Smc3 par Eco1 permet de stabiliser l'interaction entre Smc3 et Scc1/Mcd1/Rad21 et d'empêcher la déstabilisation par Wpl1/Rad61-Pds5. La cohésion est maintenue jusqu'à l'anaphase, où la Séparase entraîne le relâchement des chromatides sœurs de la cohésion par le clivage de Scc1/Mcd1/Rad21. La désacétylation de Smc3 par Hos1 permet le recyclage de l'hétérodimère Smc3-Smc1. Tiré de (362).

1.6.3. La cohésine comme régulateur transcriptionnel

Plusieurs évidences suggèrent un rôle de régulateur de l'expression génique pour la cohésine, indépendamment de la cohésion des chromatides sœurs. Premièrement, chez l'humain, elle interagit avec CTCF et l'assiste dans l'isolation et la régulation transcriptionnelle (327, 363). De plus, elle est impliquée dans la régulation de l'expression de gènes spécifiques aux tissus indépendamment de CTCF (364). De façon surprenante, l'impact de la cohésine sur la transcription n'est pas restreint à la phase S, mais peut avoir lieu même en phase G1 chez l'humain et la drosophile (327, 365).

Chez *S. cerevisiae*, la cohésine influence aussi l'expression génique. Elle est impliquée dans des interactions de longue distance pour activer la transcription et dans l'établissement de frontière à la propagation de l'hétérochromatine par le complexe SIR au niveau du site HMR (366). La cohésine est aussi retrouvée au niveau d'une région non transcrite des répétitions ribosomales et au niveau des sous-télomères (367-369). Ces régions étant aussi sous l'effet d'une répression transcriptionnelle par le complexe SIR, il est possible que la cohésine y joue aussi un rôle d'établissement de frontière pour limiter la propagation de l'hétérochromatine. De plus, l'utilisation du mutant *scc1-73*, qui ne peut plus interagir avec Smc1-Smc3, mène à la dérégulation de l'expression d'environ 15% des gènes et à l'altération de l'occupation des histones à ces sites (370). Il est à noter que les régions sous-télomériques sont particulièrement sensibles aux effets de ce mutant (370). Finalement, l'inactivation du complexe de chargement Scc2-Scc4 par les mutant *scc2-4* ou *scc4-4* mène à des changements transcriptionnels similaires (371).

1.7. Les réarrangements chromosomiques grossiers (GCRs)

Des défauts dans la régulation de la cohésion durant la réplication du génome et durant l'anaphase peuvent mener à des bris de chromosomes et induire une instabilité génomique. De plus, la recombinaison homologue nécessite le maintien de la cohésion entre chromatides sœurs et une anomalie dans ce processus peut entraîner des événements de recombinaison inadéquats. Cette section couvre les réparations inadéquates des cassures d'ADN, et notamment le rôle de la télomérase dans la réparation de cassures dans l'ADN.

Lorsque des DSBs ne peuvent être réparés ou sont mal réparés, cela peut mener à la sénescence, l'apoptose ou à de l'instabilité génomique dû à des réarrangements chromosomiques grossiers (GCRs). Ceux-ci peuvent être sous forme de délétions, de translocations chromosomiques, de fusion inter-chromosomiques, d'inversions/duplications ou d'ajout d'un télomère au DSB (372). Ces réarrangements modifient de façon majeure le génome. Une inversion ou duplication peut changer le nombre de copie de gènes (372). Une translocation réciproque peut altérer l'expression des gènes en changeant leur contexte chromosomique et mener à des fusions de gènes (372). La fusion entre deux chromosomes entraîne la formation d'un chromosome avec deux centrosomes. Ceux-ci vont se briser durant la ségrégation des chromosomes et induire une nouvelle cassure sujette à plus de GCR (372). Une translocation non-réciproque ou l'ajout *de novo* d'un télomère induit la perte des gènes situés sur la partie du chromosome n'ayant pas de centrosome (372). Si ceux-ci sont essentiels, cela induira la mort cellulaire. Les translocations et fusions sont le produit d'une réparation erronée par les voies de réparation par ligation des extrémités (373). Ces voies de réparation peuvent aussi mener à des inversions et duplications (373). L'ajout d'un télomère au site de cassure, quant à lui, nécessite le recrutement de la télomérase à cette cassure et constitue le réarrangement le plus commun parmi les GCRs (373) (Fig.11).

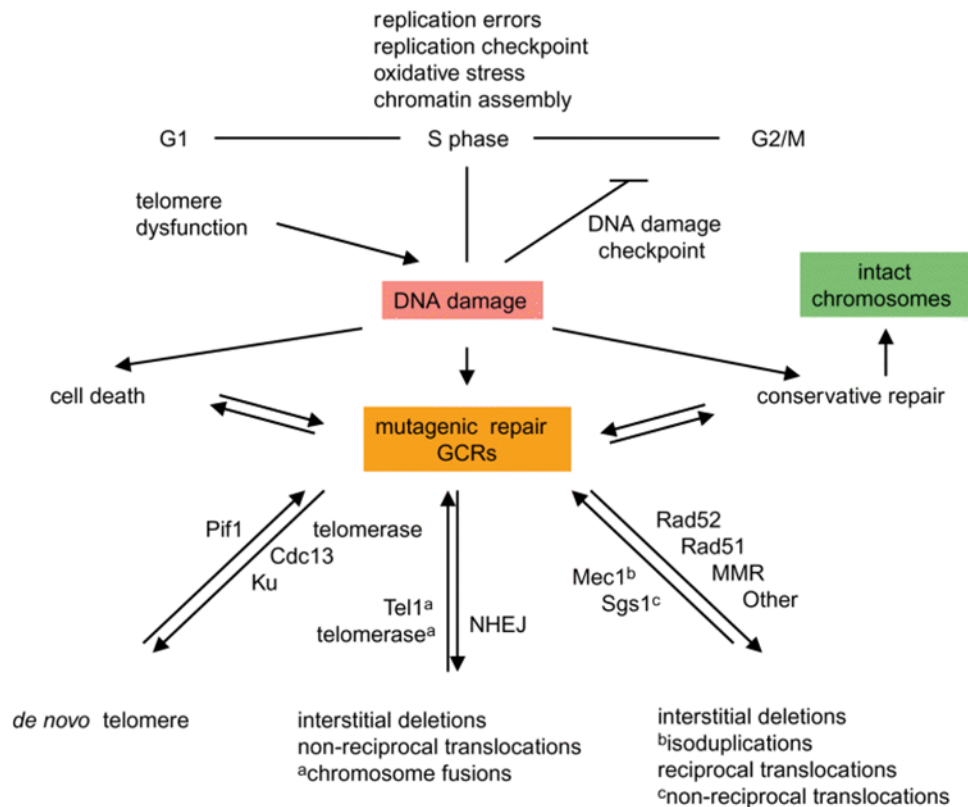


Figure 11. – Voies influençant la génération de réarrangements chromosomiques grossiers (GCR).

Plusieurs phénomènes peuvent mener à la formation de dommages à l'ADN. Le raccourcissement des télomères menant à leur détection comme un dommage, les erreurs de réplication, le stress oxydatif et le mauvais assemblage de la chromatine en sont des exemples. Les dommages à l'ADN entraînent un arrêt du cycle cellulaire pour permettre leur réparation. Dans le cas de leur réparation adéquate, l'intégrité génomique est préservée. Sinon, les dommages à l'ADN peuvent mener à la mort cellulaire ou être réparés de façon inadéquate. Ces réparations sont nommées réarrangements chromosomiques grossiers (GCR). Les GCRs peuvent être de plusieurs types dépendamment de la voie de réparation utilisée. La mauvaise utilisation de voies de réparation par recombinaison peut mener à des délétions, des duplications et des translocations. La mauvaise utilisation des voies de réparation par ligation des extrémités non-homologues peut mener à des délétions, des translocations non-réciproques et des fusions entre chromosomes. Dernièrement, la télomérase peut procéder à la réparation si elle est recrutée au dommage menant à l'ajout *de novo* d'un télomère. Tiré de (373).

1.7.1. Les méthodes pour étudier l'ajout *de novo* de télomère

Les GCRs sont des événements rares et spontanés, dont la fréquence est de l'ordre de 10^{-10} (374). Il est donc difficile d'étudier les processus régulant ces événements. La méthode la plus utilisée à cette fin est l'essai de GCR (374, 375). Brièvement, le gène de sélection *URA3*, qui rend les levures sensibles à l'inhibition par l'acide 5-fluoroorotique (5-FOA), est introduit sur le bras gauche du chromosome V. Sur ce même bras, le gène *CAN1*, qui rend les levures sensibles à la canavanine (un analogue toxique de l'arginine) est aussi présent. L'ajout de ces deux composés permet de sélectionner les levures ayant perdu ces deux gènes. La mutation simultanée des deux gènes étant statistiquement très faible, seules les levures ayant procédé à un réarrangement menant à la perte du bras de chromosome pourront survivre la sélection. Pour se faire, une cassure d'ADN double brin doit avoir lieu dans une fenêtre de 12kb entre le dernier gène essentiel (*PCM1*) et le premier gène de sélection (*CAN1*). Grâce à cette méthode, il est possible d'étudier l'effet de délétions sur le taux de GCR et en tirer des conclusions. De plus, il existe plusieurs dérivés de cette technique où différents éléments de la région de GCR sont modifiés (376). Ces dérivés sont utilisés pour tester l'impact de la présence de structures telles des G-quadruplexes, la présence de séquences tels des répétitions de triplets ou la présence de processus tels la transcription active ou l'hétérochromatinisation (376). Finalement, la caractérisation des sites de réarrangements permet d'identifier le type de GCR ainsi que la position et la séquence environnante du GCR (377, 378) (Fig.12).

Une autre méthode utilisée pour étudier l'ajout *de novo* de télomère est l'induction d'une cassure double brin par l'introduction d'un site de restriction unique dans le génome, et le suivi de ce site par immunobuvardage de type Southern (379, 380). Des enzymes de restriction telles que HO ou Sce1, qui coupent à des sites peu communs, sont souvent utilisées. Cette méthode permet d'étudier, comme l'essai GCR, l'effet de délétions sur l'ajout de télomère, mais aussi la dynamique de celle-ci. Elle permet aussi un contrôle précis des séquences environnantes pour étudier comment celles-ci influencent le recrutement de la télomérase et l'ajout de séquences télomériques au DSB.

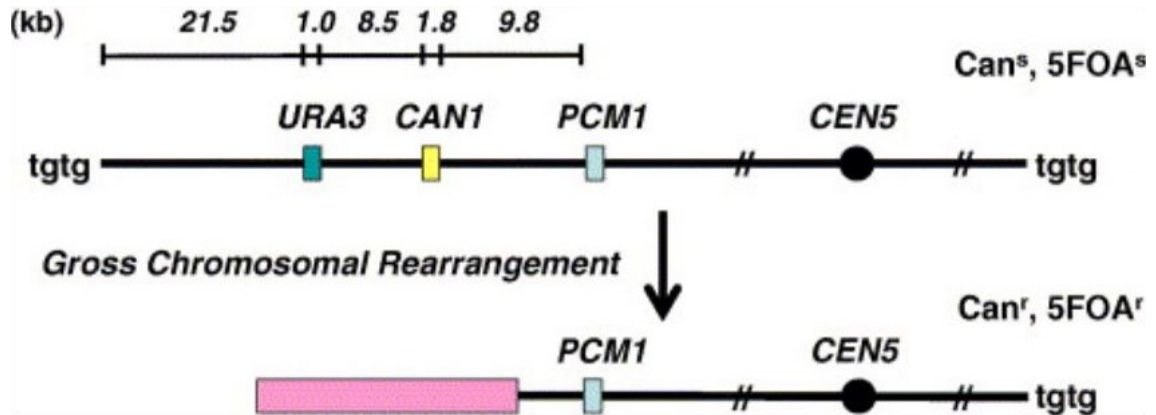


Figure 12. – Schématisation de l’essai GCR chez la levure.

Deux gènes, *CAN1* et *URA3*, sont présents dans le bras gauche du chromosome 5 et permettent d’effectuer une sélection négative. Les levures possédant ces deux gènes seront sensibles à la canavanine ainsi qu’au 5-FOA. Pour développer une résistance à ces deux composés, les cellules doivent se débarrasser de ces deux gènes. Pour se faire, un DSB doit être réparé par GCR entre la fin du premier gène essentiel, *PCM1*, et la fin du premier gène de sélection, *CAN1*. Tiré de (380).

1.7.2. La régulation de l’ajout *de novo* de télomère

Considérant les risques liés à l’ajout d’un télomère à un DSB, plusieurs voies existent pour empêcher ce phénomène. Par l’essai GCR, l’effet de la délétion de plusieurs gènes a pu être testé pour identifier les voies réprimant l’ajout *de novo* d’un télomère. Plus de 200 gènes ont été identifiés et sont regroupés dans les fonctions suivantes : la réplication de l’ADN, la réparation des dommages à l’ADN, la réponse aux dommages à l’ADN, la maintenance des télomères, la réponse au stress oxydatif, le contrôle du cycle cellulaire, la SUMOylation, les pores nucléaires et l’assemblage de la chromatine (372). On voit ainsi que l’augmentation du nombre de dommages à l’ADN ainsi que des entraves dans les voies de réparation classiques

augmente le nombre de GCRs. Plusieurs régulateurs spécifiques de l'ajout *de novo* de télomère existent. Parmi eux se trouve l'hélicase Pif1, la localisation des dommages à l'ADN aux pores nucléaires, la SUMOylation, la phosphorylation de Cdc13 par Mec1, la régulation de l'activité de la télomérase par le cycle cellulaire et la compétition avec la machinerie de recombinaison homologue (Fig.11).

Pif1 est une hélicase impliquée dans l'inhibition de la télomérase aux télomères et aux DSBs (381, 382). Grâce à son activité hélicase, elle peut dissocier la télomérase de son substrat et donc empêcher son action. Son impact est visible par l'effet du mutant *pif1-m2*, qui n'exprime que l'isoforme mitochondrial de Pif1, ou la délétion de *PIF1*, qui résulte en une augmentation de 250 à 1000X plus d'événements de GCR (383). Cette augmentation est essentiellement due à l'ajout *de novo* de télomère car la délétion de sous-unités de la télomérase supprime l'effet de la mutation de *pif1* (383).

Comme expliqué à la section 1.5.3.1., les DSBs persistantes montrent une localisation préférentielle aux pores nucléaires ou à la membrane nucléaire dépendamment des voies de réparation favorisées; la localisation aux pores nucléaires étant défavorable aux GCRs. Cette localisation dépend de la SUMOylation des DSBs par Mms21 et Siz2, et de l'interaction avec Slx5-Slx8. Cette régulation est donc importante pour inhiber l'ajout *de novo* de télomère. En effet, les délétions de *SLX5* ou de *SLX8* entraînent une augmentation des événements de GCR d'environ 70X et les délétions de certaines protéines des pores nucléaires entraînent quant à elles une augmentation de 10 à 50X (384). L'importance des SUMO ligases est démontrée par l'augmentation de plus de 80X des événements de GCR par la mutation de *mms21*, la SUMO ligase du complexe Smc5-Smc6, ou la délétion des autres gènes de ce complexe. Les autres SUMO ligases, Siz1 et Siz2, montrent peu ou pas d'effet sur la formation de GCR. La délétion de *SIZ1* montrant une augmentation de seulement 3X (384).

Comme mentionné plus haut, Cdc13 est important pour le recrutement de la télomérase aux télomères. La mutation *cdc13-2*, une mutation empêchant son interaction avec la télomérase, supprime l'effet de la mutation de *pif1* sur le nombre de GCRs détectés (58, 383, 384). Cdc13 joue donc un rôle central dans le recrutement de la télomérase aux sites de

dommages à l'ADN (380). Par contre, l'association de Cdc13 aux DSBs est inhibée par sa phosphorylation par la kinase Mec1 (380). Le recrutement artificiel et forcé de Cdc13 à un DSB augmente le taux de GCR et rends l'ajout *de novo* de télomère insensible à la phosphorylation par Mec1, supportant ainsi le rôle de Mec1 dans le contrôle de l'association de Cdc13 aux DSBs(380). Mec1 joue aussi un rôle dans l'activation de Pif1:un mutant de *pif1* incapable d'être phosphorylé par Mec1 montre ainsi un taux de GCR similaire à la délétion de *PIF1* (385).

Un autre mécanisme d'inhibition de l'ajout *de novo* de télomère est la restriction de l'activité de la télomérase en phase S. En effet, si un DSB se produit en G1, le cycle cellulaire sera arrêté pour permettre la réparation, empêchant ainsi l'interférence de la télomérase dans ces processus. Par contre, lorsque les DSBs se produisent en phase S/G2, d'autres mécanismes existent pour inhiber l'ajout *de novo* de télomère. La machinerie de HR, étant le mode privilégié en phase S pour la réparation des DSBs, joue un rôle important dans l'inhibition des GCRs par la compétition pour le substrat. L'effet de la machinerie de HR sur les GCRs est par contre difficile à cerner. Est-ce seulement par compétition ou certaines protéines jouent un rôle supplémentaire? Par exemple, le nombre de GCR augmente de 100X dans des cellules délétées de *RAD52*, alors que la délétion de *RAD51* montre un effet modéré (augmentation de 10X seulement) (374, 384). Rad52 et Rad51 sont les deux protéines centrales au HR et donc on s'attendait à un effet similaire. La différence observée pourrait être expliqué par la compensation de la sous-voie d'hybridation simple brin (SSA) suite à la délétion de *RAD51*. Une autre possibilité serait que Rad52 joue un rôle supplémentaire dans l'inhibition des GCRs ou bien que Rad51, en plus d'être nécessaire pour la HR, est aussi nécessaire à l'ajout *de novo* de télomère.

1.7.3. Les sites préférentiels pour l'ajout *de novo* de télomère

Un focus important de l'étude de l'addition *de novo* de télomère est la caractérisation des séquences génomiques rendant un DSB propice à servir de substrat à la télomérase. L'induction par l'enzyme de restriction HO d'un DSB et l'étude de l'impact de la présence de

séquences télomériques au site de cassure a démontré une préférence pour les extrémités riches en TG (386, 387). La caractérisation des sites d'ajout *de novo* de télomère par l'essai GCR a aussi confirmé une préférence pour les sites ayant 3-6 pb de TG (378). De plus, la caractérisation des séquences proches des sites de cassures induites par une enzyme de restriction a aussi montré que la présence d'une séquence riche en nucléotides TG d'environ 35 pb dans les 50 kb proches de la cassure aidait au recrutement de la télomérase (388, 389). Ces données pointent vers un modèle en deux parties où la présence de nucléotides TG est nécessaire pour l'hybridation de la télomérase et la présence d'une séquence riche en nucléotides TG en amont de la cassure facilite la liaison de facteurs de recrutement, tel que la protéine télomérique Cdc13 possédant une affinité pour les séquences riches en nucléotides TG (386, 388). Par contre, contrairement aux études effectuées avec l'endonucléase HO, l'analyse des évènements d'ajout de télomère *de novo* avec l'essai GCR n'a pas démontré la présence de région riche en nucléotides TG en amont du site d'addition d'un télomère, démontrant l'utilité d'une seule courte amorce de 3-6 pb pour le recrutement de la télomérase (378). Cependant, la séquence minimale permettant le recrutement de Cdc13, qui est important pour le recrutement de la télomérase, est de 11 nt, donc 6 nt seraient insuffisants pour cette protéine (390). D'autres facteurs doivent donc contribuer au recrutement de Cdc13.

Au-delà d'une taille minimum, le nombre de nucléotides TG au site de cassure influence aussi le recrutement de la télomérase. Une séquence de 80 nucléotides riche en TG au site d'une cassure induite par une enzyme de restriction est suffisante pour permettre la reconnaissance de ce site comme un télomère et non comme une cassure d'ADN. Toute inhibition du recrutement de la télomérase par les voies de réponses aux dommages à l'ADN est donc évitée et la régulation du recrutement de la télomérase se passe comme à un télomère (26, 379, 391). L'étude de l'impact du nombre de nucléotides TG au site de cassure a montré que l'augmentation de la longueur de la séquence riche en TG augmente l'affinité de la télomérase pour ces sites dans des cellules délétées de l'hélicase *PIF1*. Ceci renforce la notion que Pif1 constitue une barrière importante à l'addition *de novo* de télomère.

1.8. La modulation du métabolisme cellulaire en réponse au stress comme source de stress génomique

Les dommages à l'ADN sont dangereux et représentent un risque pour la survie de la cellule si ceux-ci ne sont pas réparés ou mal réparés. Parmi les sources de dommages à l'ADN, on retrouve notamment le stress environnemental et le métabolisme. Les organismes unicellulaires sont plus sensibles à ces sources et ont besoin de mécanismes d'adaptation du métabolisme plus efficaces que les organismes multicellulaires. En effet, lorsqu'un changement environnemental se présente, un organisme multicellulaire peut répondre à ce changement en se déplaçant vers un environnement plus adapté alors que les organismes unicellulaires doivent ajuster leur métabolisme pour survivre au nouvel environnement. On peut alors remarquer que l'adaptabilité cellulaire et biochimique chez les vertébrés est inférieure aux capacités d'adaptation des invertébrés, plantes, bactéries et archéobactéries (392). Ces changements environnementaux nécessitant une adaptabilité comprennent la diminution de la quantité de nutriments disponibles, l'exposition à des substances toxiques, l'augmentation ou la diminution de la température, de l'osmolarité ou du pH. Cette adaptabilité est visible chez *Saccharomyces cerevisiae* dans la régulation de l'utilisation des sources de carbones comme source d'énergie. La levure préfère les monosaccharides fermentables tels que le glucose et le fructose comme source d'énergie car ceux-ci peuvent entrer directement dans la glycolyse. En présence de glucose, la levure va donc inhiber l'utilisation de di- ou de polysaccharides comme le galactose, le sucrose ou le maltose. Elle va aussi inhiber l'utilisation des sources de carbone plus pauvres comme l'acétate, l'éthanol, le glycérol et l'oléate (393, 394). Lorsque le glucose commence à manquer, la levure doit utiliser ces sources alternatives d'énergie. Par contre, elle va générer plus de molécules oxydantes et donc augmenter le stress oxydatif qui risque de menacer l'intégrité du génome.

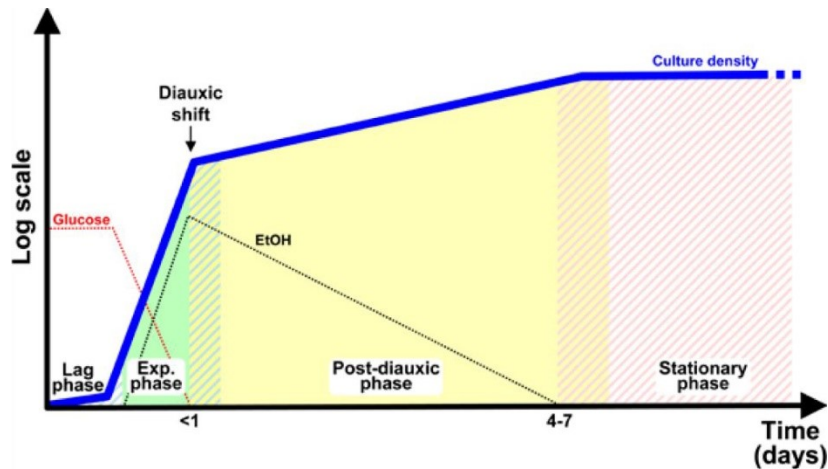


Figure 13. – La transition diauxique.

En phase de croissance exponentielle, les levures utilisent la fermentation du glucose comme source d'énergie et produisent de l'éthanol comme produit secondaire. Lorsque la concentration en glucose diminue sous une valeur critique, la croissance de la culture diminue pour permettre une reprogrammation du métabolisme et utiliser l'éthanol comme substrat pour la respiration oxydative. S'en suit une période de croissance lente jusqu'à l'épuisement de l'éthanol et l'entrée des cellules en quiescence durant la phase stationnaire de croissance. Tiré de (395).

1.8.1. La transition diauxique

Saccharomyces cerevisiae préfère la fermentation à la respiration cellulaire comme voie métabolique énergétique. La fermentation, bien qu'elle génère moins d'ATP par molécule de glucose, est plus rapide et donc est privilégiée (396). La fermentation du glucose entraîne la formation d'éthanol en produit secondaire. Cela permet à la levure d'utiliser celui-ci comme source d'énergie lorsque le glucose commence à manquer. Ce changement de la fermentation du glucose à l'utilisation aérobique des molécules non-fermentables comme l'éthanol permet une utilisation totale du carbone et est nommé la transition diauxique (396). En culture, la transition diauxique prend place lorsque la concentration du glucose descend sous 0,2% (397).

Les levures arrêtent alors de proliférer pour quelques heures, ce qui permet une altération majeure de leur programme transcriptionnel permettant l'adaptation à la respiration oxydative. L'altération de la transcription touche plus de 1700 gènes et vise les réseaux métaboliques et l'adaptation au stress oxydatif créé par la respiration oxydative (398). En effet, environ 2% de l'oxygène utilisé par le métabolisme subira une réduction incomplète et entraînera la création de peroxyde d'hydrogène ou de radicaux hydroxyl réactifs (399). La cellule doit donc contrebalancer cette augmentation du stress oxydatif pour protéger son génome. Cette production vient en partie de la synthèse de molécules antioxydantes et d'enzymes comme les superoxydes dismutases, les catalases et peroxydases (400). Après la transition diauxique, la culture continue à proliférer, quoique deux à trois fois moins rapidement jusqu'à épuisement total des sources de carbone (397). Les levures entrent alors en phase stationnaire où elles sont hautement résistantes au stress et au manque de nutriments (Fig.13).

1.8.2. La régulation transcriptionnelle du métabolisme énergétique en fonction de la présence de glucose

En phase de croissance logarithmique et en l'absence de stress, plusieurs voies s'assurent d'une utilisation optimale de l'énergie et du métabolisme. Le réseau de signalisation de la protéine kinase A (PKA) dépendante de l'AMP cyclique (cAMP) et la signalisation par Torc1 inhibent la réponse aux stress et la gluconéogenèse et favorisent la glycolyse, la synthèse protéique, la prolifération et la croissance (401, 402).

La présence de glucose dans le milieu inhibe la transcription de plusieurs gènes notamment les gènes impliqués dans la respiration oxydative, la gluconéogenèse et le cycle du glyoxylate (396). Les gènes impliqués dans l'import et la métabolisation des sources alternatives de carbone sont aussi réprimés ainsi qu'une grande famille de gènes impliquée dans la réponse au stress (396). Le contrôle transcriptionnel par le glucose se fait principalement par l'intermédiaire du complexe répresseur Mig1 et de la kinase Snf1 (396). Mig1 est une protéine

liant l'ADN et recrute le complexe inhibiteur de la transcription Ssn6-Tup1 (403). La régulation de la liaison de Mig1 à ses cibles se fait en contrôlant sa localisation cellulaire (404). En effet, lorsque la concentration de glucose est suffisante, Mig1 est localisée au noyau où elle est libre d'effectuer sa fonction. Par contre, en l'absence de glucose, la kinase Snf1 phosphoryle Mig1 induisant sa relocalisation au cytoplasme. Snf1 est en complexe avec Sip1, Sip3, Gal83 et Snf4 (405). Les protéines Sip1, Sip3 et Gal83 jouent un rôle structural permettant l'interaction avec Snf4, qui régule l'activité kinase de Snf1 (405). En présence de glucose, le domaine régulateur de Snf1 s'associe avec son domaine kinase ce qui mène à son auto-inhibition (406). En l'absence de glucose, le domaine activateur de Snf4 interagit avec le domaine régulateur de Snf1 libérant ainsi le domaine kinase de Snf1 qui, par la phosphorylation de Mig1, entraîne sa relocalisation au cytoplasme (405).

D'autres systèmes de contrôle de la transcription existent en réponse au manque de glucose. En effet, plus de 30 gènes jouant un rôle dans l'utilisation de l'éthanol, la gluconéogenèse et le cycle du glyoxylate sont sous le contrôle de l'activateur Cat8 durant la transition diauxique(407). Le complexe activateur Hap1 est nécessaire pour la transcription de plusieurs gènes impliqués dans le cycle de Krebs et dans la chaîne de transport des électrons (408). Aussi, plusieurs gènes montrent une expression régulée durant la transition diauxique dépendante des facteurs de transcription impliqués dans la réponse au stress environnemental (ESR), Msn2 et Msn4 (409).

1.8.3. La transition diauxique et les télomères

Peu de choses sont connues sur les télomères en phase stationnaire et durant la transition diauxique. En phase de croissance exponentielle, les télomères se regroupent en 5 à 6 foci périnucléaires (141, 410). Cette localisation aide au contrôle de l'activité de la télomérase, à la répression de la transcription télomérique et à la répression de la recombinaison aux télomères (141, 154, 410, 411). Par contre, Guidi et al., ont démontré que lors de l'épuisement du glucose, la localisation des télomères change (412). En effet, les télomères vont se

rassembler en un seul large focus et se relocaliser au centre du nucléoplasme (412). Ce changement phénotypique est dépendant de Sir3 mais indépendant de son activité de répression transcriptionnelle et est lié à une augmentation du potentiel de survie des cellules (412). De plus, la formation d'un focus unique est dépendante de l'augmentation du stress oxydatif par l'établissement d'un métabolisme respiratoire (412). Le retrait du glucose d'une culture en phase exponentielle n'induit pas de changement phénotypique, prouvant la nécessité du changement de métabolisme. Par contre, l'augmentation du stress oxydatif en phase exponentielle de croissance contourne cette nécessité (412). Une autre étude chez *S. pombe* par Maestroni et al., a montré l'augmentation de l'expression de TERRA, de la formation de boucles R (R-loops) et de la recombinaison des séquences sous-télomériques des télomères courts chez les cellules en phase stationnaire, confirmant l'impact de la phase post-diauxique sur les télomères (413). Cependant, ce n'est pas clair si un tel phénomène est observé chez la levure *S. cerevisiae*.

1.9. Problématique, Hypothèses et Objectifs

Les résultats présentés dans cette thèse traitent de la localisation et de l'expression des ARN non-codants liés aux télomères, l'ARN *TLC1* et TERRA. La télomérase est régulée de façon à restreindre son activité aux télomères. Un défaut dans sa régulation peut mener à des problèmes de maintien des télomères, mais aussi à la reconnaissance d'une cassure d'ADN comme un substrat pour l'ajout *de novo* de télomère, ce qui favorise la perte d'information génétique et l'instabilité génomique. Les mécanismes cellulaires inhibant l'ajout *de novo* de télomères sont cependant encore peu caractérisés.

Notre laboratoire avait précédemment étudié le trafic nucléo-cytoplasmique de l'ARN *TLC1* et son implication dans la biogénèse du complexe télomérase et sa localisation aux télomères. Durant ces travaux, nous avons observé que l'ARN *TLC1* s'accumule dans le nucléole en phase G2/M du cycle cellulaire, alors qu'il est majoritairement nucléoplasmique en G1/S.

Nous avons émis l'hypothèse que le trafic de l'ARN *TLC1* pourrait être impliqué dans la suppression des événements d'ajout *de novo* de télomères aux cassures d'ADN double brin. En effet, l'exclusion nucléolaire des voies de réparations des cassures d'ADN et l'accumulation nucléolaire en G2/M de l'ARN *TLC1* permettrait une séparation physique entre la télomérase et les sites de réparation de cassure à l'ADN.

Dans ce contexte, les objectifs de cette partie de la thèse étaient :

- D'étudier le trafic de l'ARN *TLC1* durant le cycle cellulaire ainsi que les facteurs régulant ce trafic.
- D'étudier le lien entre la régulation du trafic nucléaire de l'ARN *TLC1* et la suppression des événements d'ajout *de novo* de télomère.
- De développer une approche génomique globale pour identifier et caractériser les événements d'addition *de novo* de télomère par séquençage à haut-débit.

Pour la deuxième partie de cette thèse, nous nous sommes intéressé à l'ARN non-codant télomérique TERRA, qui est impliqué dans la régulation de la télomérase et permet la concentration et le recrutement préférentiel de la télomérase aux télomères courts. L'expression de TERRA est intimement lié à sa fonction et son étude permet de mieux comprendre les processus liant l'état des télomères et l'activité de la télomérase.

Les travaux de notre laboratoire et d'autres groupes ont montré que l'expression de l'ARN TERRA, bien que contrôlée aux niveaux transcriptionnel et post-transcriptionnel, est induite aux télomères courts. Cependant, les mécanismes impliqués dans la régulation de l'expression de TERRA ne sont pas encore bien caractérisés. Ainsi, lors d'étude par microscopie, nous avons observé une perte de cohésion prématurée en phase S au niveau des télomères exprimant TERRA. Étant donné l'impact de l'ancrage des télomères à la membrane nucléaire et l'agrégation des télomères sur la répression de la transcription sous-télomérique, nous proposons que l'organisation structurelle et la localisation de télomères pourrait réguler l'expression de TERRA.

De plus, des études récentes ont montré que l'expression de TERRA est aussi régulée de façon indépendante de la longueur des télomères en réponse à différents stress, notamment au stress oxydatif. Durant nos travaux, nous avons observé par microscopie une augmentation de l'expression de TERRA dans les levures approchant la quiescence, en fin de culture. Étant donné que la réponse au stress environnemental chez les levures implique un ajustement majeur du programme transcriptionnel, nous avons émis l'hypothèse que l'expression de TERRA pourrait être régulée suite à une augmentation du stress oxydatif, notamment lors de l'ajustement du métabolisme cellulaire durant la transition diauxique. Les objectifs de cette partie de la thèse sont:

- D'étudier comment le complexe de la cohésine et la cohésion aux télomères régule l'expression de TERRA et comment le raccourcissement des télomères influence cette régulation.
- De déterminer l'impact du changement de métabolisme durant la transition diauxique sur la régulation de l'expression et la localisation de TERRA.

Dans son ensemble, cette thèse explore la régulation de l'activité de la télomérase par différents stress cellulaires, notamment par leurs effets sur la localisation de l'ARN *TLC1* et sur l'expression et la localisation de TERRA.

2. Article 1 –Séparation spatiale de la télomérase aux sites de dommages à l'ADN selon le cycle cellulaire

Cell cycle–dependent spatial segregation of telomerase from sites of DNA damage

Auteurs: Faissal Ouenzar*, Maxime Lalonde*, Hadrien Laprade, Geneviève Morin, Franck Gallardo, Samuel Tremblay-Belzile, Pascal Chartrand

Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Université de Montréal, Montréal, H3J 3J7, Québec, Canada.

* contribution équivalente

Publié dans : Journal of Cell Biology, vol. 216, pp. 2355-2371 (2017). doi: 10.1083/jcb.201610071

2.1. Mise en contexte

Cet article a pour but d'étudier le trafic intranucléaire de l'ARN de la télomérase en fonction du cycle cellulaire avec une approche d'hybridation in situ en fluorescence (RNA FISH) (179) (annexe 2). Nous avons précédemment observé que ce trafic était affecté par la présence de cassures dans l'ADN. Comme la télomérase est connue pour pouvoir interférer avec la machinerie de réparation et être recrutée à une cassure d'ADN double brin pour favoriser l'ajout *de novo* de télomère, nous avons exploré le rôle de ce trafic dans le contrôle du recrutement de la télomérase aux cassures d'ADN. Dans cet article nous montrons comment la localisation de la télomérase au nucléole en phase G2/M permet de contrôler l'accès aux cassures dans l'ADN. Aussi, nous démontrons comment des protéines de la recombinaison homologue (Rad51 et Rad52) et la SUMOylation contrôlent ce trafic de la télomérase en présence de cassures dans l'ADN. Finalement, pour étudier l'impact de ce trafic sur l'ajout *de novo* de télomère, nous avons développé une nouvelle technique en utilisant le séquençage Illumina pour identifier les événements d'ajout de télomères dans le génome. Cette technique prometteuse permettra de mieux caractériser les événements d'ajout *de novo* de télomères à l'échelle du génome entier et sans biais de sélection.

2.2. Contribution des auteurs

La conception et le design des expériences ont été effectués par Pascal Chartrand, Faissal Ouenzar (pour la partie de la microscopie) et moi-même (pour la partie des ajouts *de novo* de télomère). Franck Gallardo est à l'origine du projet. Faissal Ouenzar a effectué la majeure partie des expériences de microscopie. Geneviève Morin et moi-même y avons aussi participé. Samuel T-Belzile a aidé au design de l'approche bioinformatique. Hadrien Laprade a effectué les expériences de facs et de résection. J'ai effectué les expériences de GCR, d'essai de

sensibilité à la bléomycine et du développement de la détection des événements d'ajout *de novo* de télomère par séquençage Illumina.

2.3. Texte de l'article

2.3.1. Abstract

Telomerase can generate a novel telomere at DNA double-strand breaks (DSBs), an event called *de novo* telomere addition. How this activity is suppressed remains unclear. Combining single-molecule imaging and deep sequencing, we show that the budding yeast telomerase RNA (*TLC1* RNA) is spatially segregated to the nucleolus and excluded from sites of DNA repair in a cell cycle–dependent manner. Although *TLC1* RNA accumulates in the nucleoplasm in G1/S, Pif1 activity promotes *TLC1* RNA localization in the nucleolus in G2/M. In the presence of DSBs, *TLC1* RNA remains nucleolar in most G2/M cells but accumulates in the nucleoplasm and colocalizes with DSBs in *rad52Δ* cells, leading to *de novo* telomere additions. Nucleoplasmic accumulation of *TLC1* RNA depends on Cdc13 localization at DSBs and on the SUMO ligase Siz1, which is required for *de novo* telomere addition in *rad52Δ* cells. This study reveals novel roles for Pif1, Rad52, and Siz1-dependent sumoylation in the spatial exclusion of telomerase from sites of DNA repair.

2.3.2. Introduction

DNA double-strand breaks (DSBs) are one of the most cytotoxic forms of DNA damage, and their repair is critical for maintenance of genome integrity and cell survival. Classically, two pathways of DSB repair have been defined: nonhomologous end joining (NHEJ) and homologous recombination (HR). NHEJ, which occurs preferentially in G1, directly rejoins the DNA ends and often results in loss of genetic information at the break site (414, 415). HR, which occurs during

S and G2 phase, requires an homologous template for repair and generally preserves genetic information at the break site (414, 416). The choice of DSB repair by the HR or NHEJ pathway is dictated in part by the presence or absence of 5'-to-3' resection, which generates 3' single-stranded DNA (ssDNA) tails at the DSB ends and commits DSB repair to HR.

In addition to HR and NHEJ, DSBs can be repaired by the action of telomerase at the break site, a phenomenon referred to as telomere healing or de novo telomere addition, which often leads to gross chromosomal rearrangements (GCRs)(373, 386). Telomere healing has been particularly well studied in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In yeast, telomerase is composed of an RNA moiety called *TLC1*, which contains the template sequence and acts as scaffold on which the catalytic reverse transcription Est2 and associated proteins (Est1, Est3, and yKu70/80) bind (79, 86, 417). Recruitment of telomerase to telomeres during S phase depends on the interaction between Est1 and the telomeric DNA single-strand binding protein Cdc13 (59, 418, 419).

Telomere healing events in yeast are suppressed by numerous mechanisms. One includes the 5'-3' DNA helicase Pif1 that acts as a potent inhibitor of telomere addition at telomeres and DSBs (381, 382). Pif1-deficient cells have overelongated telomeres and a rate of telomere healing that is dramatically increased compared with WT cells (383). Pif1 is phosphorylated upon DNA damage in a Mec1-dependent manner, and a phosphorylation-defective mutant of Pif1 (*pif1-4A*) displays an increased propensity to add telomeric repeats on an HO endonuclease-induced DSB (385). In addition to Pif1, the Mec1 kinase phosphorylates Cdc13 on its S306 residue, a phosphorylation event suggested to suppress Cdc13 recruitment to DSB ends that have little or no telomere-like sequences (380). However, recent evidence shows that these mechanisms are not sufficient to repress all Cdc13 and telomerase recruitment events at DSBs because Cdc13 and telomerase subunits can be detected at a DSB by chromatin immunoprecipitation, even if no telomere is added to the break (138, 232, 420, 421).

These results suggest a competition between de novo telomere addition and other repair pathways. Indeed, decreased resection by simultaneous deletion of *SGS1* and *EXO1* partially affects HR and increases de novo telomere formation via the recruitment of Cdc13 to

the break site (420, 422), suggesting that Cdc13 binding to DSB might be a limiting factor for telomere addition. In agreement with this, artificial binding of Cdc13 or Est1 subunit to an HO-induced DSB increases the repair of DSB by telomerase (418). Another factor involved in HR that affects de novo telomere addition is Rad52, although its role in this process is controversial. Indeed, deletion of *RAD52* does not increase spontaneous telomere addition at HO-induced or spontaneous DSB in yeast (383, 386, 388). However, deletion of *RAD52* increases the frequency of telomere addition in subtelomeric regions (423). Furthermore, the deletion of *RAD52* acts synergistically with the *pif1-m2* mutation, an allele that reduces the nuclear activity of Pif1, to increase de novo telomere addition (383), suggesting a specific but still unknown role for Rad52 in the suppression of telomere healing.

Previous studies on telomere healing were performed using methods that measure telomerase recruitment or de novo telomere elongation at a single unrepaired endonuclease-induced DSB (424). Although these approaches revealed extensive mechanistic details on this process, they also showed that sequences surrounding the DNA break and location of the break in the chromosome affect the efficacy by which telomerase recruitment and telomere healing can occur (424). However, novel approaches are needed to study the behavior, dynamics, and regulation of telomerase molecules in the presence of random breaks in the genome.

In this study, we address this question by visualizing the spatial distribution of telomerase molecules in the presence of random DSBs using single-molecule fluorescent in situ hybridization on endogenous *TLC1* RNA. With this approach, we found that *TLC1* RNA is engaged in an intranuclear trafficking during the cell cycle, as it accumulates in the nucleoplasm in G1/S, whereas it localizes preferentially in the nucleolus in G2/M. This trafficking depends on the helicase Pif1, suggesting a role for this process in the regulation of de novo telomere addition. Indeed, treatment with the radiomimetic drug bleomycin increases the presence of *TLC1* RNA molecules in the nucleoplasm in G2/M cells. We show that Rad52 suppresses the nucleoplasmic localization of *TLC1* RNA in G2/M by inhibiting Cdc13 accumulation at DSBs. Furthermore, we found that the SUMO E3 ligase Siz1 regulates the nucleoplasmic accumulation of *TLC1* RNA and de novo telomere addition without affecting Cdc13 accumulation at DSBs. Altogether, our data

show that Pif1, Rad52, and Siz1 act together to control the accumulation of *TLC1* RNA and Cdc13 at DSBs and spatially exclude telomerase into the nucleolus, away from sites of DNA repair.

2.3.3. Results

2.3.3.1. *TLC1* RNA nuclear distribution varies during the cell cycle

Previous studies used FISH to show that *TLC1* RNA accumulates in the nucleoplasm in G1 and S phase, which is related to its function in telomere elongation (74, 425). Because the telomerase RNA is the limiting component of the telomerase holoenzyme in yeast (88), its dynamics should reflect the dynamics of the active telomerase complex in vivo better than other telomerase components. However, a systematic analysis of the distribution of *TLC1* RNA in each phase of the cell cycle has not yet been conducted. To do so, quantification of telomerase RNA in the nucleus of yeast cells at different phases of the cell cycle was performed using FISH on the endogenous *TLC1* RNA. Budding index was used to determine the cell cycle phase of each cell. Beside *TLC1* RNA, the yeast nucleolus was detected using a probe against the *ITS1* ribosomal RNA spacer precursor, and the nucleoplasm was labeled using DAPI. We detected between 3 and 10 nuclear *TLC1* RNA foci per cell, with each focus corresponding to a single *TLC1* RNA molecule, as recently reported (426). Although cells in G1 and S phase displayed a nucleoplasmic accumulation of *TLC1* RNA foci, as previously shown (74), a predominantly nucleolar accumulation of *TLC1* RNA foci was observed in G2/M cells, as shown by colocalization with the *ITS1* ribosomal RNA precursor (Fig. 14, A and B). Accumulation of *TLC1* RNA in the nucleolus in G2/M was further validated by cell synchronization with nocodazole (see Fig. 15 C). To identify factors required for this intranuclear trafficking of *TLC1* RNA, we focused on factors known to regulate telomere length. One of these factors is the Pif1 5'–3' helicase, which removes telomerase from telomeres in late S/G2 and acts as a negative regulator of telomerase activity (381, 382). Quantification of *TLC1* RNA localization during the

cell cycle in a *pif1Δ* strain shows that deletion of PIF1 inhibits the nucleolar accumulation of *TLC1* RNA in G2/M, as *TLC1* RNA accumulated in the nucleoplasm in all the phases of the cell cycle (Figs. 14 C and S1 A). This result was validated using the *pif1-m2* mutant, an allele with reduced nuclear activity of Pif1 (381). This mutant displays a phenotype midway between WT and *pif1Δ* strains, with *TLC1* RNA present in both nucleoplasm and nucleolus in G2/M (Fig. 14 D and S1B). Altogether, these results suggest that Pif1 promotes the trafficking of *TLC1* RNA from the nucleoplasm to the nucleolus in G2/M.

2.3.3.2. Regulation of *TLC1* RNA nuclear trafficking by Rad52 after DNA damage

Given that *TLC1* RNA molecules accumulate preferentially in the nucleolus during G2/M, we hypothesized that the nucleolar localization of *TLC1* RNA could reduce the capacity of telomerase to interfere with HR to repair DSBs in G2/M (379). Indeed, in the yeast *S. cerevisiae*, HR is mostly excluded from the nucleolus, and DSBs in ribosomal DNA (rDNA) are repaired by HR in the nucleoplasm, suggesting that HR is exclusively nucleoplasmic (289, 427). Furthermore, Pif1, which promotes the trafficking of *TLC1* RNA to the nucleolus, inhibits de novo telomere addition by telomerase at DSBs (381, 428). To test this hypothesis, the distribution of *TLC1* RNA molecules was determined by FISH after induction of DNA damage using bleomycin, a radiomimetic agent that preferentially generates DSBs (429). Yeast cells were exposed to 5 µg/ml bleomycin for 180 min, conditions that cause 90% of the cells to have at least one DSB per cell (Fig. S2 A). After treatment with bleomycin, FISH was performed to detect both *TLC1* and *ITS1* RNA. *TLC1* RNA foci remained predominantly nucleolar in both bleomycin treated and untreated G2/M cells (Fig. 15 A). However, quantification of the phenotypes revealed a small but significant accumulation of G2/M cells with *TLC1* RNA in the nucleoplasm in bleomycin-treated cells (Fig. 15 B), suggesting that DNA damage affect the nucleolar distribution of this RNA. To confirm the link between *TLC1* RNA accumulation in the nucleolus and repair of DSB in the nucleoplasm, HR was inhibited by deletion of *RAD52*. Surprisingly, the percentage of G2/M cells with nucleolar *TLC1* RNA foci decreased from 70% in WT cells to 30% in *rad52Δ* cells

treated with bleomycin, and most cells accumulated *TLC1* RNA foci predominantly in the nucleoplasm or in both compartments (Fig. 15, A and B).

To determine if the nucleoplasmic accumulation of *TLC1* RNA in the presence of DSBs is caused by its retention in the nucleoplasm or by its relocation from the nucleolus to nucleoplasm, yeast cells were synchronized in G2 with nocodazole (Fig. S2 B), followed by treatment with bleomycin. Although nocodazole-treated cells displayed *TLC1* RNA foci in the nucleolus, treatment with bleomycin still resulted in the redistribution of *TLC1* RNA foci toward the nucleoplasm in *rad52Δ* cells, suggesting a dynamic trafficking of this RNA between these two compartments (Fig. 15, C and D). Altogether, these results suggest that in cells containing DSBs, *TLC1* RNA can relocate from the nucleolus to the nucleoplasm and that its nucleolar retention depends on *RAD52*.

2.3.3.3. *TLC1* RNA colocalizes with DSB sites in the nucleoplasm

To understand the significance of the nucleoplasmic accumulation of *TLC1* RNA in DNA damaged cells devoid of Rad52, the colocalization between *TLC1* RNA and a cytological marker of DSBs was measured. Rfa1, the largest subunit of the heterotrimeric complex RPA, was used as a marker, because it is recruited to DSBs and binds ssDNA generated by resection (430, 431). For this reason, Rfa1 is frequently used as a specific cytological marker for DNA end processing in vivo (432-434). Rfa1 was fused to GFP and, similarly to ionizing radiation–induced DSBs, a single Rfa1-GFP focus was observed in cells treated with bleomycin, in both WT and *rad52Δ* cells (Fig. 16 A). To validate this assay, colocalization between *TLC1* RNA and Rfa1-GFP foci in G2/M was measured in *pif1-m2* cells treated with bleomycin. Because Pif1 plays a key role in removing telomerase from DSBs and inhibits de novo telomere addition (383), we expect an increased colocalization between *TLC1* RNA and Rfa1-GFP foci in *pif1-m2* compared with WT cells. Indeed, we observed a colocalization between a Rfa1-GFP focus and a *TLC1* RNA focus in 29% of *pif1-m2* cells treated with bleomycin, whereas such colocalization was observed in 16% of WT cells (Fig. S3 A). FISH was performed on Rfa1-GFP *rad52Δ* cells to detect endogenous *TLC1* RNA after

bleomycin treatment. In 31% of the cells, one of the *TLC1* RNA foci colocalized with an Rfa1-GFP focus (Fig. 16 A and Fig. S3 B). This percentage is higher than in WT cells (Fig. S3 A) or compared to the colocalization of *TLC1* RNA foci with a random nuclear focus (corresponding to the *MDN1* transcription site), which colocalize only in 9% of the cells (Fig. S3 C).

It is possible that *TLC1* RNA nucleoplasmic foci that are not colocalized with a Rfa1-GFP focus could be associated with other DNA damage sites (Fig. S3 D). To test this possibility, another cytological marker of DSB, γ -H2A, was combined with FISH on *TLC1* RNA. In contrast to Rfa1-GFP, γ -H2A form several foci in mammalian and yeast cells after DNA damage (435, 436). In yeast, γ -H2A accumulation is a direct readout of Mec1 activity at a DSB (199). Simultaneous FISH against *TLC1* RNA and immunofluorescence (IF) with an antibody specific to γ -H2A was performed in cells treated or not with bleomycin. In these conditions, yeast cells exposed to 5 μ g/ml bleomycin during 180 min contained between two and four γ -H2A foci per cell, whereas untreated cells did not contain any foci (Fig. 16 B). As observed with Rfa1-GFP, most *TLC1* RNA foci were in the nucleoplasm in *rad52 Δ* cells treated with bleomycin, but only one *TLC1* RNA focus colocalized with one of the γ -H2A foci in 45% of the cells (Fig. 16 B). Altogether, these results show that during DNA damage and in the absence of Rad52, most *TLC1* RNA molecules are excluded from the nucleolus and accumulate in the nucleoplasm in G2/M, and a fraction of these molecules accumulate at DSBs.

2.3.3.4. *TLC1* RNA nucleoplasmic accumulation after DNA damage depends on Cdc13 and the MRX complex, and is regulated by the DNA damage response pathway

The observation that *TLC1* RNA molecules colocalize with only a fraction of the DSBs raises questions concerning the link between *TLC1* RNA trafficking and the DNA damage response. To confirm that *TLC1* RNA accumulation in the nucleoplasm depends on the DNA damage response, factors upstream of Rad52, like the MRX complex (Mre11 and Xrs2), the ATM-like kinase Tel1 and the ATR-like kinase Mec1 were deleted in *rad52 Δ* background cells to

test their ability to suppress the nucleoplasmic accumulation of *TLC1* RNA (Fig. 17 A). None of these deletions had any effect on the nucleolar distribution of *TLC1* RNA in G2/M cells in the absence of DSBs. After induction of DSBs, deletion of *MRE11* or *XRS2* completely suppressed the nucleoplasmic accumulation of *TLC1* RNA in *rad52Δ* cells (Fig. 17 B). This result is consistent with a function of MRX complex in DSBs processing and de novo telomere addition (8). However, deletion of *TEL1* partially suppressed the nucleoplasmic accumulation of *TLC1* RNA in *rad52Δ* cells, as this RNA accumulated in both nucleolus and nucleoplasm (Fig. 17 B). Given the role of Tel1 in DNA resection, it is possible that Tel1 might regulate *TLC1* RNA nucleoplasmic accumulation by positively influencing the function of the MRX complex in the processing of DSBs, as it was shown to do at telomeres (437). On the other hand, deletion of *MEC1* has no significant effect on *TLC1* RNA trafficking (Fig. 17 B). Although Mec1 inhibits telomerase activity at DSBs by decreasing Cdc13 binding and by phosphorylation of the telomerase inhibitor Pif1 (380, 385), this activity is not required for *TLC1* RNA trafficking, because this RNA still accumulated in the nucleolus. Altogether, these results are consistent with a model in which DSB processing and resection is required for *TLC1* RNA relocation from the nucleolus to nucleoplasm in the absence of *RAD52*.

This model predicts that resected DSBs may retain telomerase in the nucleoplasm, and this retention should be mediated by a ssDNA-binding protein. Indeed, the single-strand telomeric binding protein Cdc13 was previously shown to be essential for the recruitment of telomerase at DNA breaks (418). This was revealed by using the *cdc13-2* mutant, which disrupts the interaction between Cdc13 and the telomerase subunit Est1 (58). We therefore tested the effect of the *cdc13-2* mutation on the distribution of *TLC1* RNA after DNA damage. In a WT *RAD52* background, induction of DSBs in the *cdc13-2* strain reduced the accumulation of *TLC1* RNA in the nucleoplasm compared with a WT strain (Fig. S4 A). This effect is even more striking in a *cdc13-2 rad52Δ* strain, as *TLC1* RNA did not accumulate in the nucleoplasm after exposure to bleomycin, showing that the *cdc13-2* mutation completely suppressed the *rad52Δ* phenotype (Fig. 17, B and C). This result suggests that the Cdc13-Est1 interaction is essential for nucleoplasmic accumulation of *TLC1* RNA after DNA damage.

2.3.3.5. Cdc13 clusters increase after DNA damage and accumulate at DSB sites

The abovementioned results show that in the absence of Rad52, Cdc13 plays a key role in the nucleoplasmic accumulation of *TLC1* RNA after induction of DSBs. Recent work has shown that Cdc13 can be detected at a DSB by chromatin immunoprecipitation (138, 232, 420, 421). We therefore examined whether *TLC1* RNA nucleoplasmic accumulation is caused by the accumulation of Cdc13 at DSBs in WT and *rad52Δ* cells. Endogenous Cdc13 was tagged with 13 myc epitopes, and IF was performed to detect the distribution of myc-tagged Cdc13. In WT cells treated with bleomycin, Cdc13-13Myc accumulated as dim subnuclear foci in 20% of G2/M cells (Fig. 18, A and B). Surprisingly, deletion of *RAD52* increased the number of cells with Cdc13 foci to more than 85% (Fig. 18 B). These results were confirmed using a Cdc13-GFP fusion protein in living yeast cells, which revealed the presence of a Cdc13 focus in over 50% of *rad52Δ* cells after bleomycin treatment (Fig. S4 B). The Cdc13 foci formed in *rad52Δ* cells were two- to threefold bigger and brighter than those observed in WT cells (Fig. 18 A and Fig. S4, C and D), likely reflecting an increased number of Cdc13 proteins associated with DSBs. To distinguish the larger Cdc13 foci observed in *rad52Δ* from the dimmer Cdc13 foci, we renamed the larger foci Cdc13 clusters. Notably, these clusters were only formed in *rad52Δ* cells in G2/M after DNA damage, with 65% of the cells containing one cluster and fewer cells containing two clusters (Fig. 18 D), suggesting that Rad52 inhibits Cdc13 accumulation at DSBs. However, we still detected Cdc13 foci in the same percentage of cells in both *rad52Δ* and WT cells (Fig. 18 C).

To determine if Cdc13 accumulates at DSBs after bleomycin addition, the DSB marker Rfa1 was used to investigate the colocalization between Cdc13-GFP and Rfa1-mCherry in G2/M. Cdc13-GFP clusters colocalized with a Rfa1-mCherry focus in 69% of the cells (Fig. 18 E), indicating that Cdc13 accumulates at DSBs. To test if Cdc13 foci/clusters are also formed in the absence of another mediator of HR, such as Rad51, Cdc13 foci/cluster formation was measured in *rad51Δ* cells after bleomycin treatment. Indeed, a previous study had shown that Cdc13 recruitment to an irreparable HO-induced DSB is highly reduced in *rad51Δ* cells (232). Strikingly, both Cdc13 foci and clusters disappeared in *rad51Δ* cells (Fig. 18, B and C), whereas *TLC1* RNA accumulated in the nucleolus in those cells (Fig. 18 F), reflecting that Rad51 positively influences

Cdc13 accumulation and *TLC1* RNA nucleoplasmic localization at DSBs. To determine the epistatic relationship between *RAD51* and *RAD52* in *TLC1* RNA trafficking, *TLC1* FISH was performed in a double-mutant *rad51Δ rad52Δ* strain. Interestingly, deletion of *RAD51* suppresses the nucleoplasmic accumulation of *TLC1* RNA observed in *rad52Δ* cells, suggesting that *RAD51* is epistatic to *RAD52* in this pathway (Fig. 18 F). Altogether, these results show that nucleoplasmic accumulation of *TLC1* RNA observed in *rad52Δ* cells is linked, in part, to an increased accumulation of Cdc13 at DSBs. In the absence of Rad52, resected DSBs may be more accessible to Cdc13 binding, which may accumulate on the ssDNA and recruit telomerase.

2.3.3.6. Temporal analysis of Cdc13 foci formation and *TLC1* RNA localization at DNA damage sites

Although the aforementioned data show that Cdc13 and *TLC1* RNA can accumulate at DSBs after induction of DNA damage, it is not clear if their association with DSBs is an early or late event during DNA repair. Indeed, a late recruitment of Cdc13 and *TLC1* RNA would probably suggest an indirect effect caused by the absence of DNA repair at DSBs and the accumulation of longer strands of ssDNA. To answer this question, we measured the kinetics of accumulation of Cdc13 and *TLC1* RNA at DSBs in *rad52Δ* cells. Yeast cells were treated with bleomycin, and culture samples were taken at different time points. Yeast cells were fixed with formaldehyde and processed for IF and/or FISH. Immunofluorescence on Cdc13-myc showed that 50% of the cells already displayed a Cdc13 focus/cluster 30 min after induction of DNA damage (Fig. 19 A). The kinetics of Cdc13 foci/cluster formation was similar to the kinetics of accumulation of γ -H2A foci (Fig. 19 A), suggesting that Cdc13 accumulated rapidly at DSB sites in the absence of Rad52. A refined analysis of Cdc13 accumulation at DSBs was performed by separately quantifying cells with Cdc13 foci or clusters over time. This analysis revealed that the number of cells containing Cdc13 foci reached a peak at 30 min and stayed stable for the remainder of the treatment (Fig. 19 B). Surprisingly, Cdc13 clusters also appeared in over 30% of the cells after 30 min of bleomycin treatment (Fig. 19 B). However, the number of cells containing a Cdc13 cluster still

increased over time. These results show that Cdc13's association with DSBs is an early process after DNA damage in the absence of Rad52.

A similar kinetic analysis was performed on *TLC1* RNA using FISH, in which the nucleoplasmic/nucleolar distribution of this RNA was quantified at different time points after induction of DNA damage. Unlike γ -H2A foci, which accumulated rapidly after DNA damage (Fig. 19 A), the nucleoplasmic accumulation of *TLC1* RNA molecules started later, between 30 and 60 min after bleomycin treatment, and reached a plateau after 120 min (Fig. 19 C). We do not think that the difference in the kinetics of *TLC1* RNA versus γ -H2A is a result of the lower sensitivity of the FISH assay versus IF, because single *TLC1* RNA molecules are detected as single foci with this assay (426). Interestingly, 30 min after induction of DNA damage, *TLC1* RNA remained in the nucleolus even if 50% of the cells contain Cdc13 foci/clusters (Fig. 19, A and C), indicating that the association of Cdc13 with the DNA break sites is not the limiting step for the nucleoplasmic accumulation of *TLC1* RNA.

These results show that nucleoplasmic accumulation of *TLC1* RNA proceeds more slowly than the formation of Cdc13 foci/clusters. However, it is possible that a small number of *TLC1* RNA molecules may associate rapidly with a DSB, whereas the majority of *TLC1* RNA molecules still remain in the nucleolus. To test this possibility, colocalization of *TLC1* RNA with Rfa1-GFP was measured in *rad52 Δ* cells during a time-course treatment with bleomycin. Surprisingly, early colocalization of a single *TLC1* RNA focus with the Rfa1-GFP focus was detected in 27% of the cells 30 min after initiation of DNA damage (Fig. 19, D and E). At this time point, most *TLC1* RNA molecules remained outside of the DAPI-stained nucleoplasm (presumably in the nucleolus) in these cells. The colocalization between *TLC1* RNA and Rfa1-GFP increased to nearly 40% of the cells after 60 min of bleomycin treatment and remained stable afterward (Fig. 19 E).

These results could be explained by a two-step process in the accumulation of *TLC1* RNA in the nucleoplasm after DNA damage. One early step, which leads to the accumulation of a small number of *TLC1* RNA molecules at a resected DSB (Fig. 19 E), and a late step, which corresponds to the global redistribution of bulk *TLC1* RNA molecules from the nucleolus to the nucleoplasm, but not directly at DSBs (Fig. 19 C). This late redistribution may be triggered by the

accumulation of unrepaired DSBs in the absence of *RAD52*. Once in the nucleoplasm, the *TLC1* RNA molecules might be associated with Cdc13 at telomeres, which would explain why in *cdc13-2* mutant, *TLC1* RNA remains in the nucleolus even in the presence of DNA damage (Figs. 19 and S4). This raises questions regarding how unrepaired DSBs could trigger this relocalization of telomerase molecules.

2.3.3.7. The E3 SUMO ligase Siz1 regulates the nucleoplasmic accumulation of *TLC1* RNA after DNA damage

The observation that *TLC1* RNA molecules are excluded from the nucleolus and accumulate in the nucleoplasm in the presence of unrepaired DSBs suggests a specific regulation of this trafficking during DNA damage. To identify regulators of the intranuclear trafficking of *TLC1* RNA, we focused on factors involved in sumoylation, a posttranslational modification that regulates DNA damage repair. Indeed, mutation or depletion of sumoylation enzymes in yeast and human cells notably results in defects in DNA repair, including recombination abnormalities and impaired DSB repair (438, 439). Furthermore, sumoylation is known to regulate Rad52 and DSBs nuclear distribution in yeast (289). In budding yeast, three mitotic SUMO E3 ligases have been identified, including two homologous Siz proteins (Siz1 and Siz2) and the Mms21 subunit of the essential Smc5/6 complex (272, 440). Several factors involved in telomere maintenance are known to be sumoylated, including Cdc13, which is a substrate of both Siz1 and Siz2 (134). Interestingly, Cdc13 sumoylation increases after DNA damage, suggesting that Cdc13 activity may be regulated by SUMO during DNA damage (134).

To determine if sumoylation regulates the spatial distribution of telomerase after DNA damage, *TLC1* RNA localization was determined in a single mutant of two SUMO E3 ligases, *siz1Δ* and *siz2Δ*, in a *rad52Δ* background after treatment with bleomycin. In the absence of DNA damage, deletion of either *SIZ1* or *SIZ2* had no effect on the localization of *TLC1* RNA to the nucleolus in G2/M (Fig. 20 A), suggesting that these SUMO E3 ligases do not regulate the cell cycle-dependent trafficking of *TLC1* RNA. Interestingly, during bleomycin-induced DNA damage,

the deletion of *SIZ1*, but not *SIZ2*, strongly decrease the nucleoplasmic accumulation of *TLC1* RNA in a *rad52Δ* strain (Fig. 20 A). These results show that Siz1, but not Siz2, controls the spatial distribution of *TLC1* RNA after DNA damage.

One trivial explanation could be that Siz1 indirectly affects the trafficking of *TLC1* RNA by modulating the processing of DSBs. To determine if Siz1 plays a role in the resection of DSBs, the kinetic of resection of a single HO cut site was measured in *rad52Δ* and *siz1Δrad52Δ* strains. No difference in the kinetic of DSB resection was observed in the absence of Siz1 (Fig. S5, A and B). Also, after DNA damage, we found that deletion of *SIZ1* did not affect the formation of Rfa1-GFP foci, a marker of DSB resection (Fig. S5 C). To identify where Siz1 acts in the DNA repair pathway, serial dilutions of *siz1Δ*, *siz2Δ*, *rad52Δ*, and double-mutant *siz1Δrad52Δ* and *siz2Δrad52Δ* strains were spotted on plates containing different concentrations of bleomycin. Unlike *SIZ2*, deletion of *SIZ1* increased the sensitivity of yeasts to bleomycin, although only at a higher concentration compared with a *RAD52* deletion (Fig. S5 D). Interestingly, the *siz1Δrad52Δ* strain showed the same sensitivity to bleomycin as a *rad52Δ* strain, showing that *RAD52* is epistatic to *SIZ1*. These results suggest that Siz1 acts downstream of Rad52 in the DNA repair pathway.

Because Siz1 is known to promote Cdc13 sumoylation after DNA damage (134), it may regulate Cdc13 clustering at DSBs and subsequent *TLC1* RNA trafficking during DNA damage. To test this hypothesis, IF on Cdc13-myc was performed in *siz1Δrad52Δ* and *rad52Δ* strains after bleomycin treatment. Cdc13 clusters and foci still formed in the *siz1Δ rad52Δ* strain as in *rad52Δ* cells (Fig. 20 B). Altogether, these results show that Siz1 is not involved in DSBs processing or Cdc13 accumulation at resected DSB but acts downstream of this process.

2.3.3.8. Siz1 promotes de novo telomere addition in the absence of RAD52

One key question is whether this cell cycle–dependent *TLC1* RNA trafficking plays a role in de novo telomere addition at spontaneous DSBs. To answer this question, we used the GCR

assay developed by the Kolodner laboratory (374). In this assay, two counterselectable markers (*URA3* and *CAN1*) are inserted near the left telomere of chromosome V. Cells that undergo a GCR event (i.e., telomere addition, translocation) that leads to simultaneous loss of *CAN1* and *URA3* can be selected by growth on medium containing 5-FOA and canavanine. Afterward, the number of GCR events corresponding to telomere healing was quantified. The GCR assay was first performed in *rad52Δ*, *pif1-m2*, and *pif1-m2 rad52Δ* strains. As previously reported (383), deletion of *RAD52* or the *pif1-m2* mutation increase telomere healing rates (Fig. 21 A). Combining the *pif1-m2* mutation with a *rad52* deletion results in a 12-fold increase in de novo telomere addition compared with the *pif1-m2* strain, as previously shown (383).

Deletion of *SIZ1* decreases the accumulation of *TLC1* RNA in the nucleoplasm of *rad52Δ* cells after DNA damage (Fig. 19 A), which should reduce de novo telomere addition and GCR rates observed in a *rad52Δ* strain. In fact, an 11-fold reduction in telomere healing rates was observed in a *siz1Δrad52Δ* strain compared with the *rad52Δ* strain (Fig. 21A). Because Pif1 is required to promote *TLC1* RNA trafficking to the nucleolus, our model predicts that inhibition of Pif1 should suppress the nucleolar accumulation of *TLC1* RNA observed in the *siz1Δrad52Δ* strain and increase GCR rates. Indeed, the *pif1-m2* mutation partially suppresses the nucleolar accumulation of *TLC1* in the *rad52Δ siz1Δ* mutant, as *TLC1* RNA molecules accumulate in both nucleoplasm and nucleolus in the triple mutant *pif1-m2 siz1Δ rad52Δ*, with or without bleomycin treatment (Fig. 21 B). Deletion of *SIZ1* in the *pif1-m2* strain reduces GCR rates by sixfold, close to the twofold reduction previously reported for this double mutant (see Fig. 21 A). This could be because Pif1 is sumoylated during DNA damage (134), and the absence of Siz1 may affect the activity of Pif1 at sites of DNA damage. Strikingly, the triple mutant *pif1-m2 siz1Δ rad52Δ* restores the telomere healing rate to levels similar to the *pif1-m2 rad52Δ* strain (Fig. 21 A), which is consistent with our model that mutation in Pif1 bypasses the need for Siz1 activity for de novo telomere addition in *rad52Δ* cells.

2.3.3.9. Identification of telomere healing events in bleomycin treated cells

Although the GCR assay shows that Pif1, Rad52, and Siz1 regulate the frequency of telomere healing events, it remains unclear if de novo telomere addition really occurs in bleomycin-treated cells. To identify de novo telomere events in cells treated with bleomycin, WT, *pif1-m2*, *rad52Δ*, and *rad52Δ siz1Δ* cells were synchronized in G2/M with nocodazole prior treatment with bleomycin for 3 h. Genomic DNA was extracted and submitted to paired-end Illumina sequencing. Analysis of Illumina paired reads identified 73 reads containing de novo telomere events (Fig. 22 A and Table S3). 96% of these reads were identified in bleomycin-treated cells, and only three reads were identified from untreated cells, suggesting that these reads are not sequencing artifacts. Although this analysis most likely underestimates the occurrence of de novo telomere addition (see Materials and methods for details), more telomere healing events were identified per million reads in *pif1-m2*, *rad52Δ*, and *rad52Δ siz1Δ* cells treated with bleomycin compared with WT treated cells.

Telomere healing events were observed on most chromosomes (Table S3). Surprisingly, 14% of the telomere healing events identified occurred in the rDNA locus on chromosome 12, which is close to the percentage of the yeast genome occupied by this locus (~11%). Analysis of the sequences upstream de novo telomere addition events revealed the absence of nucleotide insertions or deletions, which is a feature of nonhomologous end joining and microhomology-mediated end joining repair (209). However, a TG-rich bias in the 10 nt upstream of the telomere addition sites was observed (Fig. 22 B), which was also previously reported for telomerase-dependent de novo telomere events (378). Finally, the majority of these reads were found in the *pif1-m2* strain, suggesting that these events are mediated by telomerase activity.

2.3.4. Discussion

In this study, we used single-molecule imaging to study *TLC1* RNA trafficking during the cell cycle and after induction of DNA damage. Our results demonstrate that *TLC1* RNA, the limiting component of yeast telomerase, is engaged in an intranuclear trafficking during the cell cycle. In G1/S, *TLC1* RNA molecules are present in the nucleoplasm, whereas in G2/M, they accumulate predominantly in the nucleolus. We also show that this trafficking depends on the helicase Pif1 and is linked to the presence of DNA damage. In addition to Pif1, the key recombination protein Rad52 strongly controls this trafficking in the presence of DNA damage, as it specifically suppresses the accumulation of *TLC1* RNA molecules in the nucleoplasm and at DSBs generated by bleomycin by antagonizing the accumulation of Cdc13 at DNA breaks (Fig. 23).

However, the effect of a *RAD52* deletion on the accumulation of Cdc13 at DSBs may not be simply caused by the accumulation of longer resected DNA in this mutant, because the deletion of *RAD51*, which also produces long ssDNA at DSBs (216, 441), completely abolishes the formation of Cdc13 foci. Interestingly, deletion of *RAD51* suppresses the effect of a *RAD52* deletion on *TLC1* RNA trafficking. This result supports a previous observation that Rad51 is required for the recruitment of Cdc13 and Est2 to a nonrepairable DSB (232). Why Rad52 and Rad51 have opposite effects on the formation of Cdc13 foci is still unclear.

Using Illumina paired-end sequencing, we identified several reads containing de novo p09 addition events in the genome of yeasts treated with bleomycin. De novo telomere addition occurred downstream of TG-rich sequences less than 10 nt. A recent characterization of an endogenous hotspot of de novo telomere addition in yeast revealed a bipartite structure, with a TG-rich core sequence where telomere addition occurs, and an upstream proximal Stim sequence that binds Cdc13 and stimulates telomere addition (442). Interestingly, de novo telomere addition is increased at this bipartite hotspot in the absence of Rad52. Hence, because of their short TG-rich core sequence, it is possible that several of the sites of de novo telomere addition identified in the DNA-sequencing study may contain this bipartite structure. Another

surprising result is that 14% of the reads containing de novo telomeres were from the rDNA locus, suggesting the presence of telomerase activity in the nucleolus. Because DSBs in rDNA in yeast are processed in the nucleolus but repaired by HR in the nucleoplasm (289), the unusual dynamics of these DSBs between the nucleolus and the nucleoplasm may explain in part their accessibility to telomerase activity in the nucleoplasm.

In addition, we demonstrate that the E3 SUMO ligase Siz1 regulates the spatial distribution of *TLC1* RNA after DNA damage without affecting DSB processing or Cdc13 accumulation at DSBs. DNA damage is known to trigger a wave of sumoylation leading to simultaneous multisite modifications of several DNA repair proteins of the HR pathway in yeast (274). However, these sumoylation events depend on the Siz2 SUMO ligase and not on Siz1, suggesting that the effect of Siz1 on *TLC1* RNA localization is independent of the main role of SUMO in the modulation of the HR pathway. Although the effect of a *SIZ1* deletion on *TLC1* RNA trafficking might be explained by the Siz1-dependent sumoylation of Cdc13 (134), this sumoylation event was shown to inhibit telomerase binding to Cdc13. Therefore, other targets of Siz1 may be involved in this process. Sumoylation by Siz1 is required for de novo telomere addition in the absence of Rad52 and, to a lesser extent, in a *pif1-m2* strain. This requirement for Siz1 activity is completely suppressed in a double *pif1-m2 rad52Δ* mutation. These data support our model that by reducing *TLC1* RNA trafficking to the nucleolus, the *pif1-m2* mutation bypasses the spatial restriction on telomerase access to DNA breaks observed in the *siz1Δ rad52Δ* strain (Fig. 23).

In line with the observation that DNA repair is excluded from the nucleolus (231), our study reveals how the spatial segregation of telomerase and HR activities restricts telomerase access to DSBs. This process is not specific to budding yeast telomerase, because the catalytic subunit of human telomerase (hTERT) was also shown to accumulate in the nucleolus after ionizing radiation-induced DSBs (443), indicating that nucleolar localization of telomerase after DNA damage may be a conserved process during evolution.

2.3.5. Methods

2.3.5.1. Constructs and strains

Table S1 lists strain genotypes. Yeast strains were generated by disrupting the *RAD52*, *RAD51*, *SIZ1*, *SIZ2*, *MRE11*, *XRS2*, *TEL1*, or *MEC1* genes in W303 strain by a one-step PCR disruption method using KAN marker (444). The *mec1Δ* strains were kept viable by deletion of the *SML1* gene (445). In this strain, the KAN marker was removed by transforming cells with pSH47 expressed Cre recombinase. The *cdc13-2* strain transformed with the plasmid pVL438 CDC13 (Ycp33 CEN, *URA3*, and *CDC13*)(446) was obtained from R. Wellinger's laboratory (Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Canada). Deletion of *RAD52* was followed by the elimination of the pVL438 *CDC13* plasmid using 5-FOA. Strains carrying Rfa1-GFP, Rfa1-mCherry, Cdc13-GFP, and Cdc13-13Myc allele at the *RFA1* and *CDC13* chromosomal locus were generated by a PCR one-step tagging method using plasmids pFA6A-GFP-KANMX4, pFA6A-mCherry-Kan, or pFA6A-13Myc-KANMX4 (447). Verification of these strains was performed by PCR, microscopy, and/or Western blot. For Cdc13-GFP and Cdc13-13Myc strains, senescence experiments were conducted by repeatedly streaking strains. For all these strains, the *RAD52* gene disruptions were obtained by using *TRP1*, *KAN*, or Hygro markers. *RAD51* deletion was also obtained by using *TRP1* marker.

2.3.5.2. Cell-cycle dependent localization of *TLC1* RNA and induction of DSBs

Asynchronously growing WT yeast cells (W303) were grown in YEPD (yeast extract peptone-dextrose) until OD₆₀₀ 0.3 to 0.4, fixed with paraformaldehyde, and processed for FISH analysis to detect *TLC1* RNA and *ITS1* pre-rRNA. *ITS1* FISH probe was provided by D. Zenklusen (Université de Montréal, Montréal, Quebec, Canada). The cell cycle stage of the cells was estimated by measuring the bud-to-mother size ratio (budding index) as G1 (cells without bud),

S phase (cells with small to mid-size bud), and G2/M (cells with large bud or sharing the nucleus between mother and daughter). This method is highly reproducible for scoring G2/M cells, because nearly identical percentages of *TLC1* RNA distribution were measured in nocodazole-treated cells and nontreated cells (see Fig. 15, B and C). For induction of DSBs, haploid WT and *rad52Δ* strains were grown in YEPD medium (at OD₆₀₀ ~0.2) and exposed to 5 µg/ml of bleomycin (BLE011.10; Bioshop) for 180 min. In these conditions, 90% of the cells have at least one DSB after 180 min (Fig. S2). The presence and number of DNA damage per cell after bleomycin treatment were quantified using the number of γ-H2A foci, which correlates with the number of DSBs per cell (448). For nocodazole treatment, WT and *rad52Δ* cells were grown in YEPD medium to OD₆₀₀ ~0.2 before addition of 15 µg/ml nocodazole for 90 min, and synchronization of cells in G2/M was monitored by microscopy. In these conditions, more than 90% of cells are in G2/M. 5 µg/ml bleomycin was then added, and cells were incubated for another 180 min.

2.3.5.3. FISH and IF

The yeast fixation protocol and fluorescent in situ hybridization to detect endogenous *TLC1* RNA have been described previously (449). Five Cy3-labeled 50-nt probes were used to detect the endogenous *TLC1* RNA, and one Cy5-labeled 50-nt probe was used to detect the *ITS1* pre-rRNA. For colocalization experiments with endogenous Rfa1-GFP, yeast was cultured at room temperature, and fixation was performed in 1× PBS, pH 7.4, to preserve GFP fluorescence. Dual FISH-IF or IF-only protocols were conducted as described previously (450). In brief, after the last wash of 1× SSC of the FISH protocol, spheroplasts were incubated in 1× PBS containing 0.1% BSA, 1× PBS containing 0.1% BSA and 0.1% NP40, and 1× PBS containing 0.1% BSA for 2 min each at room temperature. The primary antibodies used to detect γ-H2A (18255; Abcam) or myc epitope (9E10; Roche) were diluted to 1:5,000 and 1:400, respectively, in 1× PBS containing 0.1% BSA, 20 mM VRC, and 120 U/ml RNA Guard and incubated for 2 h at 37°C. Spheroplasts were washed with 1× PBS containing 0.1% BSA, 1× PBS containing 0.1% BSA and 0.1% NP-40,

and 1× PBS containing 0.1% BSA for 2 min each at room temperature. The secondary antibody (Alexa Fluor 488 conjugate) was diluted to 1:1,000 in 1× PBS containing 0.1% BSA, 20 mM VRC, and 120 U/ml RNA Guard, and incubated 1h in the dark at room temperature. Finally, cells were washed in 1× PBS containing 0.1% BSA, 1× PBS containing 0.1% BSA and 0.1% NP-40, and 1× PBS 0.1% BSA for 1 min each at room temperature. The coverslips were incubated in 1× PBS containing DAPI before mounting on slides.

2.3.5.4. Image acquisition, deconvolution, and processing

All images were acquired using an Axio Imager 2 epifluorescence upright microscope (ZEISS) equipped with a 100× differential interference contrast (DIC) H (1.4 NA) objective and a Photometrics CoolSNAP fx CCD camera. Endogenous *TLC1* RNA foci were detected using Cy3.0 filter, *ITS1* probe was detected using Cy5.0 filter, and Rfa1-GFP or γ -H2A were detected using a FITC filter. Image acquisition times for DIC, DAPI, *TLC1* RNA, and *ITS1* pre-rRNA were 40, 20, 1,600, and 800 ms, respectively. Images were acquired and processed with ZEISS software or deconvolved by Autoquant X3 software using a theoretical PSF algorithm and analyzed using Metamorph software. 100 fields of yeast cells were acquired as Z stacks of 14 planes minimum, with 0.5 μ m between planes in the Z axis. Inspection of all focal planes of each cell was performed to quantify colocalization between *TLC1* RNA, *ITS1* pre-rRNA (nucleolus) or DAPI (nucleoplasm), with reproducible results obtained with two or three different individuals. For each yeast strain, a total of 200 G2/M cells were randomly scored in two biologically independent experiments. The linescan application of Fiji or Metamorph software was also used to quantify *TLC1* RNA, *ITS1* RNA, and DAPI fluorescence distribution in the nucleus of yeast cells. Numbers are expressed as percentage of cells with *TLC1* RNA located in the nucleoplasm or nucleolus or evenly distributed between both compartments. Simultaneous FISH on *TLC1* and *MDN1* RNA was performed to determine the percentage of colocalization of *TLC1* RNA foci with a random nuclear focus, represented by the *MDN1* transcription site. The *MDN1* FISH probes were provided by D. Zenklusen.

2.3.5.5. Live cell Imaging

Cells expressing fusion protein Rfa1-GFP, Cdc13-GFP, or Cdc13-GFP and Rfa1-mCherry in *rad52Δ* genetic background were incubated overnight at 25°C in 2 ml SC-TRP and then diluted to OD₆₀₀ ~0.2 and grown for one cell cycle. Cdc13-GFP foci and colocalization between Cdc13-GFP and Rfa1-mCherry were induced by 5 µg/ml bleomycin for 3 h. Cells were collected by centrifugation at 2,000 g, mounted on standard glass slides, and covered with a coverslip appropriate to the optics of the microscope. All the images were acquired using an Axio Imager 2 epifluorescence upright microscope (ZEISS) equipped with a 100× DIC H (1.4 NA) objective and an Evolve fx EM-CCD camera or microscope AXIO OBSERVER Z1 confocal spinning disk (ZEISS) equipped with the same objective and camera. For each field of cells, 11 fluorescent images at each of the relevant wavelengths were obtained at 0.4-µm intervals along the Z axis. Inspection of all focal planes of each cell was performed to quantify colocalization. Image acquisition times for DIC, bright-field, GFP, and mCherry were 40, 40, 900, and 60 ms, respectively.

2.3.5.6. Quantitative analysis of Cdc13 foci and clusters

Determination of Cdc13 focus and cluster diameter and maximal fluorescence intensity was calculated as described previously (450).

2.3.5.7. DSB resection assay

Yeast was grown to early-mid log phase in YEP-raffinose medium at 30°C. HO endonuclease was induced by the addition of 3% galactose. Samples were harvested before galactose addition and every 30 min after induction for 4 h. Genomic DNA was extracted and digested by PciI restriction enzyme. DNA fragments were separated on a 1% agarose gel and transferred on a neutral nylon membrane. Southern blot was performed with a probe

generated by PCR amplification of a sequence close to the HO cut site. DNA loaded at each time point was normalized using a probe against the *AGX1* gene. Intensities of bands on the Southern blot were quantified with Image Lab. Resection was measured as the ratio of the signal intensity for each time point relative to the signal intensity of the initial HO cleavage time point.

2.3.5.8. GCR assay and characterization of telomere healing events

All GCR rates were determined by fluctuation tests. Mutation rates were calculated using the median method (451). Results shown are the mean of three to five experiments using five to seven cultures. After the GCR assay, DNA was extracted from 20 5-FOA⁺ Can⁺ colonies from each strain (but only eight for the WT strain). To identify the breaking point where the GCR took place, we used the approach used in (452). In brief, 22 pairs of PCR primers were designed to cover the whole 12-kb region where the break could have happened to generate a 5-FOA⁺ Can⁺ colony. Each primer pair was designed to generate overlapping ~600-bp amplicons. Starting from the centromere-proximal extremity, the first primer pair that did not give amplification is referred as the breaking point.

Each breaking point was further analyzed to characterize the presence of de novo telomere addition at the breaks. This analysis was performed as in (452). In brief, each sample was amplified using the antisense PCR primer of the breaking point with a telomere primer (5'-CACCACACCCACACAC-3'). The antisense primer of the last working pair (flanking the breaking point) was also used with the telomere primer. Those two primer pairs served to identify de novo telomere addition. As controls, each sample was amplified using the breaking point primer pair and the last working primer pair. As a positive control, the telomere primer was used with an antisense primer that flanks the telomere 1L. Finally, one sample with a breaking point upstream of the breaking point analyzed and one downstream of it were added. Those were used as controls for the specificity of the primer pairs.

The results are displayed as a ratio of telomere healing events identified versus the number of clones characterized for each strain. Then, this ratio is applied on the spontaneous GCR rate calculated for the corresponding strain to establish a spontaneous telomere healing rate. This rate is then compared with the rate of the WT strain, which is set as 1.

2.3.5.9. Identification of telomere healing events by Illumina paired-end sequencing

Cultures were started from an OD₆₀₀ of 0.2. When the OD₆₀₀ reached 0.4, 15 µg/ml nocodazole was added to the culture. Cultures were incubated for 3 h until >80% of the cells were synchronized in G2/M. Synchronization was assessed by microscopy. If needed, 5 µg/ml bleomycin was added and cultures were incubated another 3 h before harvesting the cells. Genomic DNA was extracted, and 1 µg was sent for paired-end Illumina sequencing on an Illumina HiSeq2000. Each condition was done in duplicate. Genome coverage for each sample ranged from 25 to 210× (2,792,066 to 14,219,231 sequences).

Datasets were analyzed using a Galaxy (453) modified version of a previously published workflow (454). Sequences were filtered for a minimum length of 40 nt, an average quality of at least 20, and no more than 50 nt under a quality of 20. They were then aligned using the Burrows-Wheeler aligner against the sacCer3 reference genome (NCBI Assembly accession no. GCA_000146045.2) from which telomere sequences were removed. Read pairs for which both reads were successfully mapped do not contain de novo telomere additions and were discarded. The first 25 nt of the remaining pairs were aligned using Bowtie, and sequences which were mapped for either none or both of the paired end reads were discarded. Between 177,689 to 544,055 sequences remained for analysis in each dataset at this point. Read pairs were sorted according to the percentage of CA, CCA, and CCCA in the first 50 nt of the unmapped read. Unmapped reads with at least 24 nucleotides of telomeric repeats in their first 50 nt were then analyzed manually to identify telomere healing events. The remaining pairs were further filtered for at least 12 nt of telomeric repeats in the first 24 nt of the unmapped

read and then analyzed in the same manner. Finally, to ensure that the events found were de novo telomere addition and not random addition of TG repeats, identified sequences were compared with the *TLC1* RNA template.

Although this approach allows the detection of de novo telomere additions, it most likely underestimates their occurrence. First, Illumina sequencing biases against GC-rich and GC-poor regions may translate into fewer GC-rich telomere reads. Second, telomeres were removed from the reference genome in order for telomere-containing sequences to remain unmapped, but if the first 25 nt of a telomere sequence match an internal telomeric tract (as in the subtelomeric regions), the read was discarded after a successful alignment using Bowtie. Third, because a lot of sequences in the subtelomeric regions are shared between chromosomes ends, it is difficult to assign a sequence to a specific telomere. For this reason, subtelomeric sequences (10 kb from telomeres) were ignored in the analysis. Fourth, DNA fragments with identical sequences at both ends were ignored. These pseudopalindromes are artifacts created by the presence of long ssDNA (455). One library from the *rad52Δ* strain was discarded because of the presence of a very high number of reads with pseudo-palindromes, possibly because *rad52Δ* cells have longer resected DNA at DSBs. Lastly, because telomere sequences shorter than 12 nt were not analyzed, short de novo telomere additions were ignored. Fragmentation of the DNA near a site of telomere addition during library preparation therefore means that some occurrences were missed.

2.3.5.10. Statistical analysis

A two-tailed Student's *t* test or analysis of variance was used to calculate the statistical significance. A Mann–Whitney *t* test was used for the GCR assay. Statistical significance was defined as $P < 0.05$ (*). Calculations were performed using GraphPad.

2.3.5.11. Online supplemental material

Fig. S1 presents *TLC1* RNA localization in *pif1Δ* and *pif1-m2* strains. Fig. S2 describes quantification of γ-H2A foci and cell cycle synchronization. Fig. S3 shows the analysis of *TLC1* RNA colocalization with DSBs. Fig. S4 presents a quantitative analysis of Cdc13 foci. Fig. S5 shows that Siz1 is not involved in DSBs processing but acts downstream of Rad52 in DNA repair. Table S1 shows all yeast strains genotypes. Table S2 lists p-values of all the strains tested in Fig. 4 B. Table S3 lists all the de novo telomere addition identified by DNA sequencing.

2.3.6. Acknowledgments

The authors thank R. Wellinger, J. Cobb, R. Kolodner, D. Durocher, and L. Symington for yeast strains and D. Zenklusen (Université de Montréal) for the *ITS1* and *MDN1* FISH probes. We also thank R. Wellinger, L. Harrington, E. Querido, and M. Hendzel for critical reading of the manuscript.

This project was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-89768). M. Lalonde is supported by a fellowship from the Fonds de Recherche du Québec-Santé. F. Gallardo was supported by a doctoral fellowship from the Terry Fox Foundation. G. Morin and H. Laprade were supported by a Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada CDMC-CREATE fellowship. P. Chartrand holds a Fonds de Recherche du Québec-Santé Research Chair.

The authors declare no competing financial interests.

Author contributions: F. Ouenzar, M. Lalonde, and F. Gallardo performed FISH and IF experiments, analyzed microscopy data, and prepared strains. G. Morin helped to perform the

FISH experiments shown in Fig 17. M. Lalonde prepared strains and performed GCR assays and analysis of Illumina sequencing. H. Laprade performed GCR assays and DNA resection. S. Tremblay-Belzile helped with bioinformatics analysis. F. Ouenzar, M. Lalonde, and P. Chartrand designed the experiments and wrote the paper.

2.3.7. Footnotes

Abbreviations used:

DIC: differential interference contrast

DSB: double-strand break

GCR: gross chromosomal rearrangement

HR: homologous recombination

IF: immunofluorescence

NHEJ: nonhomologous end joining

rDNA: ribosomal DNA

ssDNA: single-stranded DNA

YEPD: yeast extract peptone-dextrose

2.3.8. Figures and tables

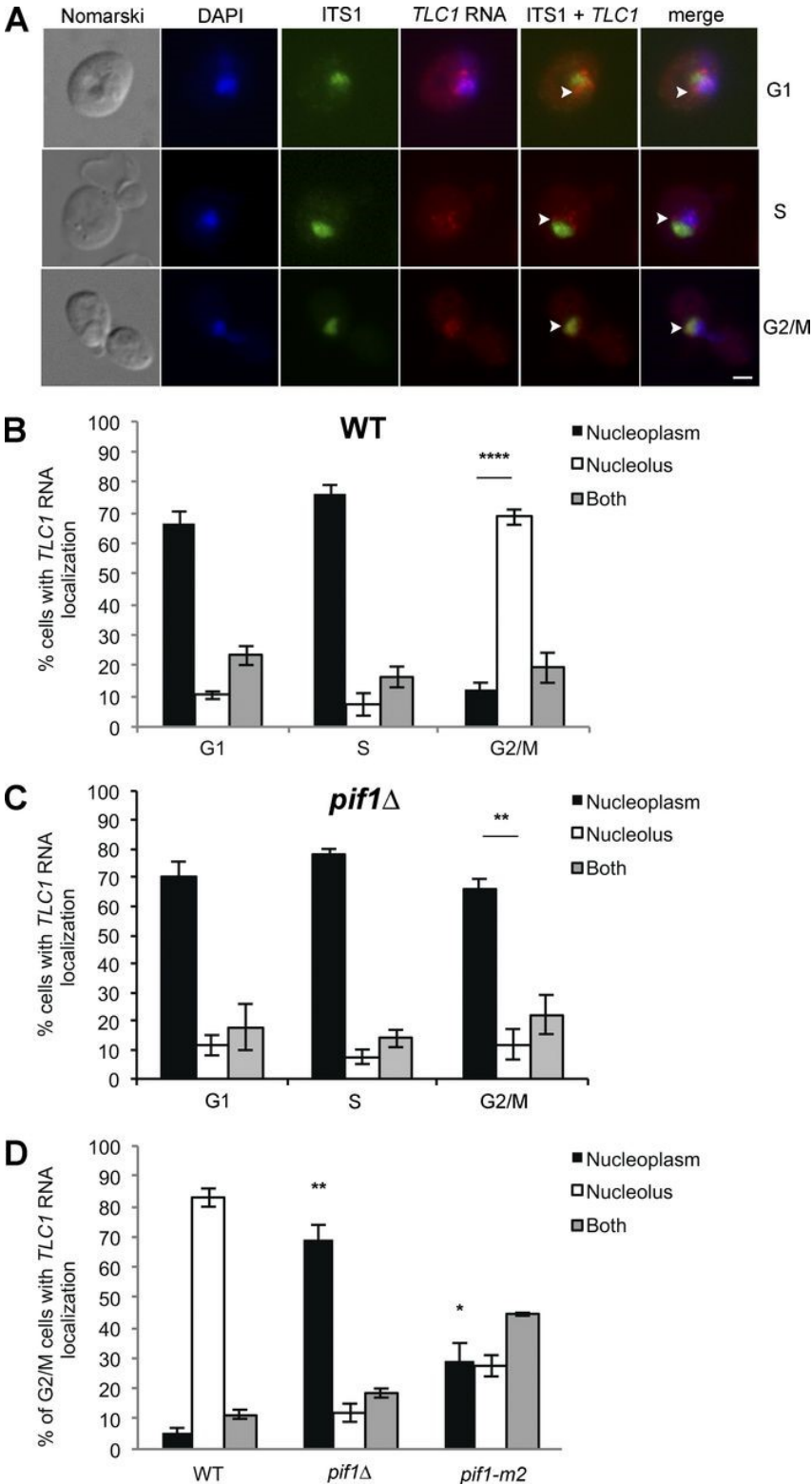


Figure 14. – Intranuclear trafficking of *TLC1* RNA during the cell cycle depends on Pif1.

(A) Monitoring *TLC1* RNA localization during the cell cycle by FISH. The nucleolus was stained with a probe against the *ITS1* spacer of the rRNA precursor (labeled with Cy5). Arrowheads mark the position of the *TLC1* RNA in selected cells. DAPI was used to stain DNA. Bar, 1 μ m. (B) Quantification of *TLC1* RNA localization during the cell cycle; n = 900 cells. (C) Quantification of *TLC1* RNA localization during the cell cycle in *pif1* Δ cells; n = 900 cells. (D) Quantification of *TLC1* RNA localization in G2/M in WT, *pif1* Δ , and *pif1-m2* cells; n = 200–900 cells. Error bars represent \pm SD. *, P < 0.05; **, P < 0.01; ****, P < 0.001 (two-tailed t test).

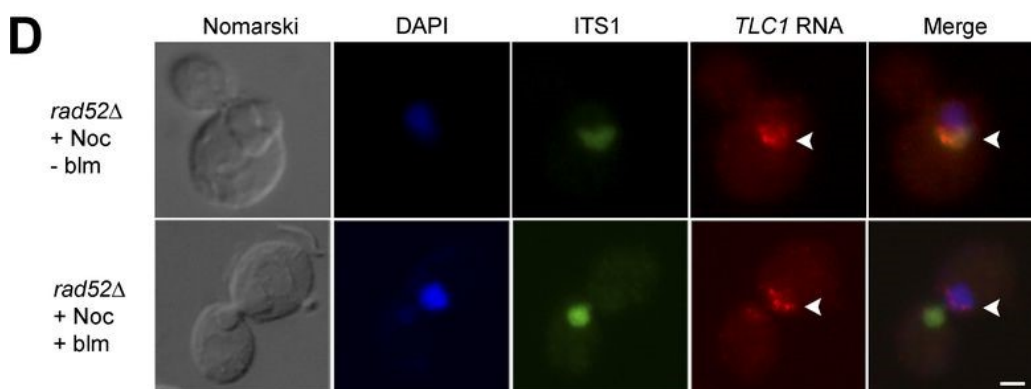
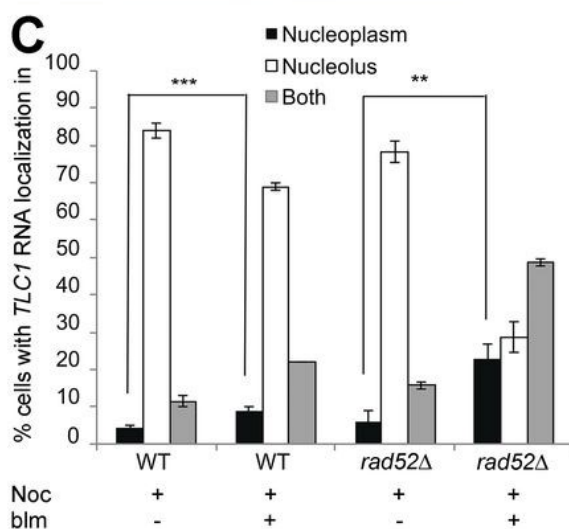
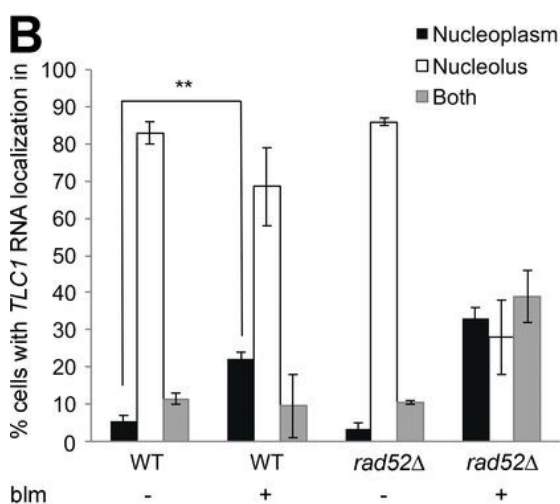
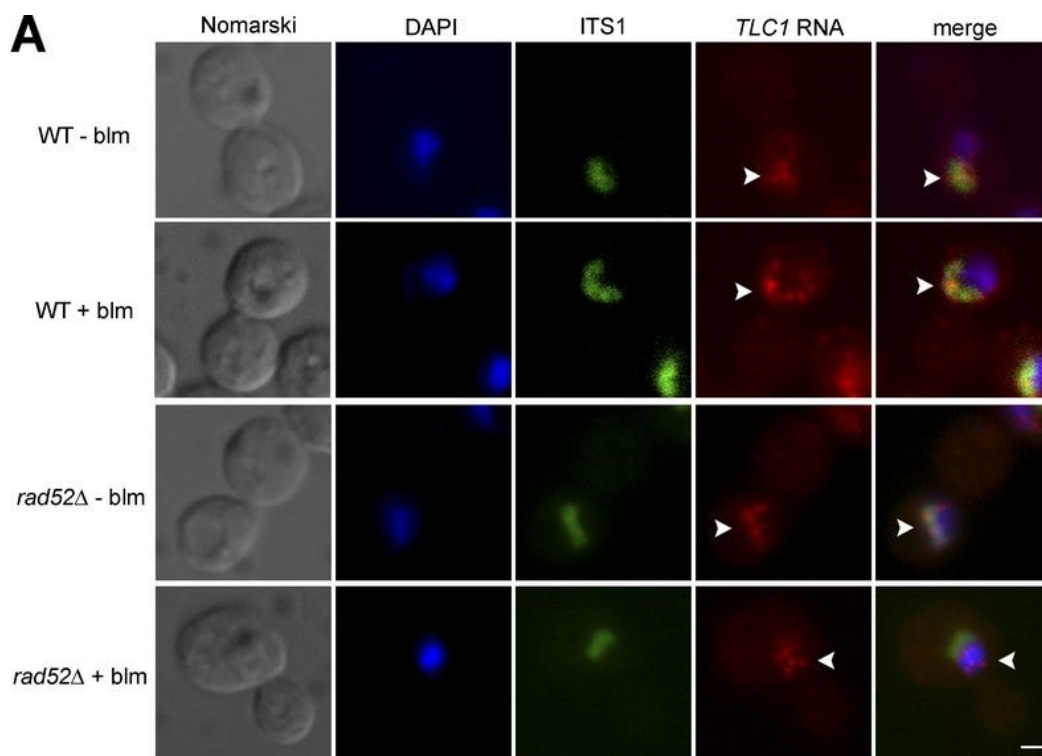


Figure 15. – *TLC1* RNA accumulates in the nucleoplasm in G2/M in *rad52Δ* cells after DNA damage.

(A) FISH on *TLC1* RNA in WT or *rad52Δ* cells treated or not with bleomycin (blm). Arrowheads indicate position of *TLC1* RNA foci in the nucleus. Bar, 1 μ m. (B) Quantification of *TLC1* RNA distribution in the nucleus in WT or *rad52Δ* cells after treatment with bleomycin (blm); n = 200 cells. (C) *TLC1* RNA can relocate to the nucleoplasm from the nucleolus in *rad52Δ* cells treated with bleomycin. Quantification of *TLC1* RNA distribution in the nucleus in WT or *rad52Δ* cells synchronized with nocodazole (Noc), followed by treatment with bleomycin (blm); n = 200–300 cells. (D) FISH on *TLC1* RNA in *rad52Δ* cells synchronized with nocodazole (Noc) and treated or not with bleomycin (blm). Arrowheads indicate position of *TLC1* RNA foci in cells. Bars, 1 μ m. Error bars represent \pm SD. **, P < 0.01; ***, P < 0.005 (two-tailed t test).

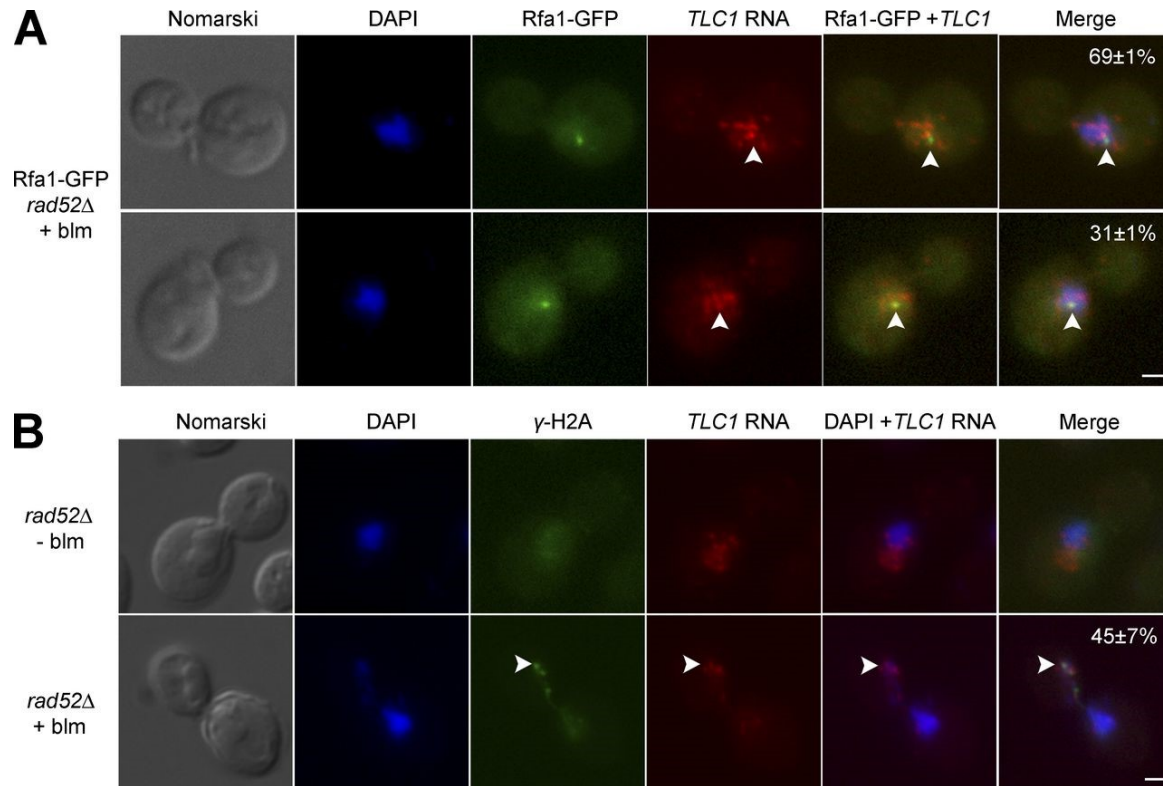


Figure 16. – *TLC1* RNA partially colocalizes with DSB sites in *rad52Δ* cells.

(A) FISH against *TLC1* RNA in *rad52Δ* cells expressing Rfa1-GFP and treated with bleomycin (blm). Numbers in percentages represent the percentage of cells with the following phenotypes: no colocalization between a *TLC1* RNA focus and Rfa1-GFP focus (top) or colocalization between a *TLC1* RNA focus and Rfa1-GFP foci (bottom). Bar, 1 μm; n = 200 cells. (B) Dual FISH against *TLC1* RNA and immunofluorescence on γ-H2A protein in *rad52Δ* cells after exposure or not to bleomycin (blm). Colocalization (indicated by arrowheads) was detected in 45 ± 7% of the cells. Bar, 1 μm; n = 200 cells.

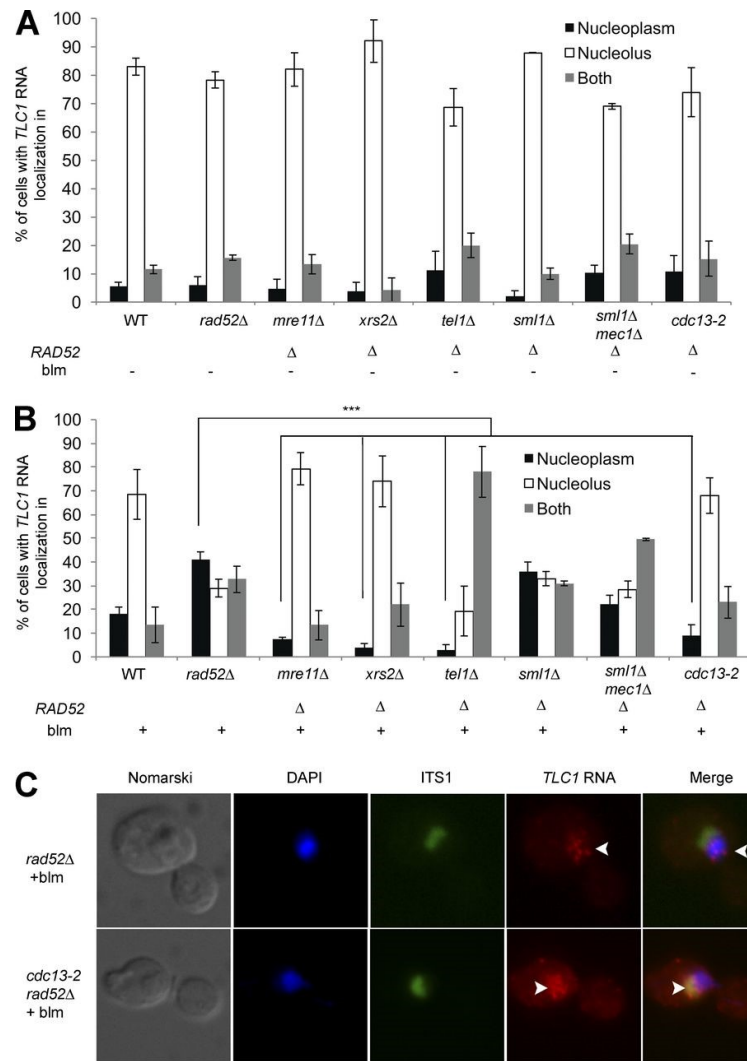


Figure 17. – Genetic requirements for nucleoplasmic accumulation of *TLC1* RNA after DNA damage in *rad52Δ* cells.

(A) *TLC1* RNA does not accumulate in the nucleoplasm in G2/M in the absence of DNA damage in *rad52Δ*, *mre11Δ rad52Δ*; *xrs2Δ rad52Δ*; *tel1Δ rad52Δ*; *sml1Δ rad52Δ*; *sml1Δ mec1Δ rad52Δ* and *cdc13-2 rad52Δ* cells. WT, *rad52Δ*, and *sml1Δrad52Δ* were used as control strains; n = 200–300 cells. (B) *TLC1* RNA nucleoplasmic accumulation after induction of DNA damage requires Mre11 and Xrs2 of the MRX complex and Cdc13 and is regulated by Tel1. p-values are included in Table S2. Error bars represent \pm SD; n = 150–300 cells. (C) FISH on *TLC1* RNA in *cdc13-2 rad52Δ* cells treated or not with bleomycin. Arrowheads indicate the position of *TLC1* RNA foci in cells. Bar, 1 μ m. ***, P < 0.005 (two-tailed t test).

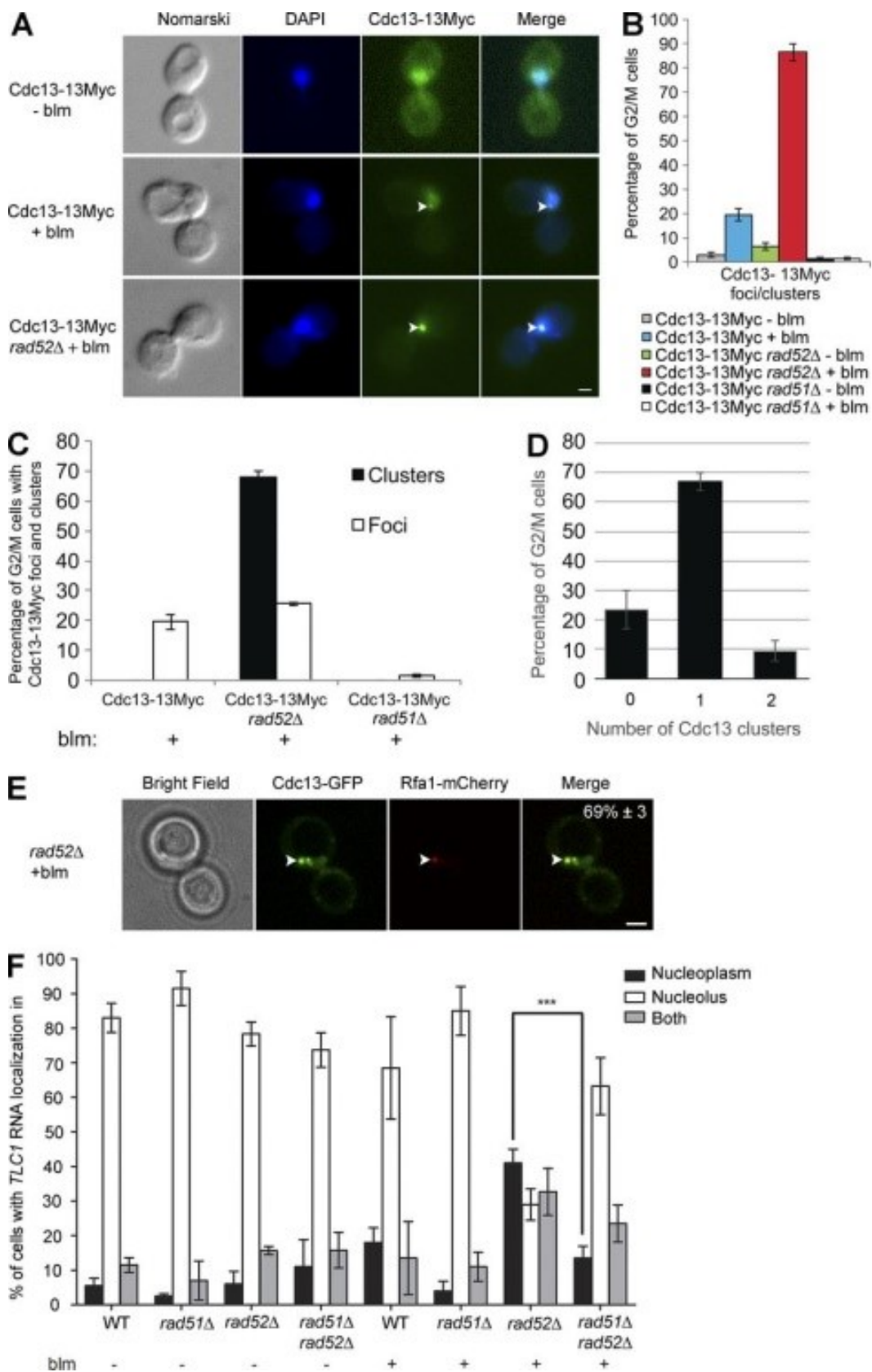


Figure 18. – Cdc13 accumulates at sites of DNA break in *rad52Δ*, but not in *rad51Δ* cells.

(A) Cdc13 foci appear in WT and *rad52Δ* cells after DNA damage. Immunofluorescence (IF) analysis of Cdc13-myc was conducted in WT and *rad52Δ* cells, with or without bleomycin (blm) treatment. Arrowheads mark the position of Cdc13 foci. Bar, 1 μ m. (B) Rad52 and Rad51 have opposite effect on Cdc13 foci formation. Quantification of Cdc13 foci/clusters formation in WT, *rad52Δ*, and *rad51Δ* strains, with or without bleomycin (blm) treatment; n = 200 cells. (C) Analysis of Cdc13 clusters and foci formation in WT, *rad52Δ*, and *rad51Δ* strains in DNA-damaged cells; n = 200 cells. (D) Quantification of the number of Cdc13 cluster per G2/M-damaged cells; n = 200 cells. (E) Colocalization of Cdc13-GFP cluster and Rfa1-mCherry focus in *rad52Δ* cell exposed to bleomycin. Arrowheads mark a colocalization event. Percentage of G2/M cells showing this phenotype is indicated in the last panel; n = 200 cells. (F) Quantification of *TLC1* RNA distribution in the nucleus in WT, *rad52Δ*, *rad51Δ*, or *rad51Δ rad52Δ* cells after treatment with bleomycin; n = 200–344 cells. Error bars represent \pm SD. ***, P < 0.005 (two-tailed t test).

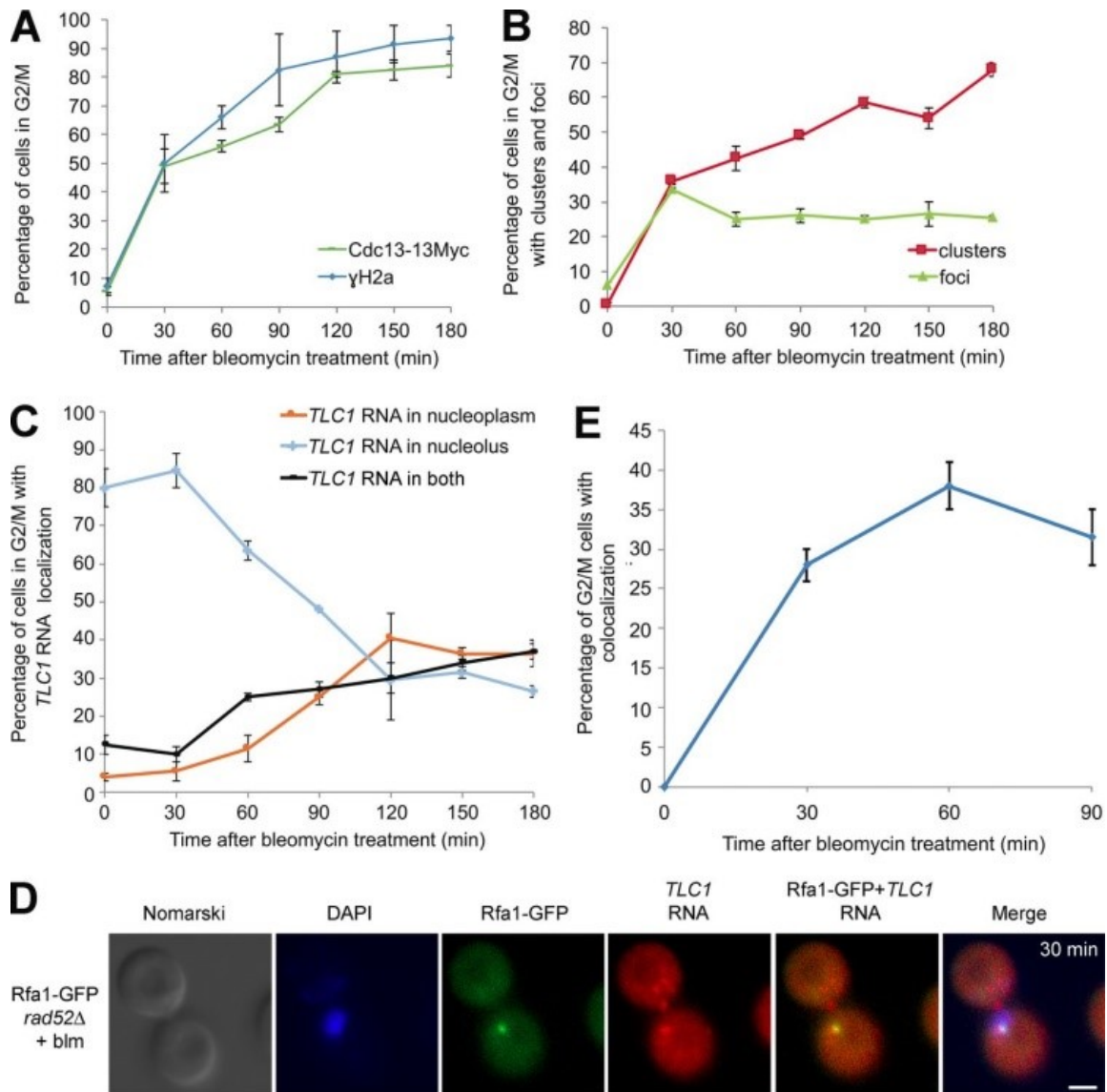


Figure 19. – Kinetics of accumulation of Cdc13 and *TLC1* RNA at sites of DNA damage in *rad52Δ* cells.

(A) Kinetics of γ -H2A and Cdc13 foci formation in G2/M cells after exposure to bleomycin. (B) Time course of Cdc13 foci and cluster formation in G2/M cells after exposure to bleomycin. (C) Kinetics of *TLC1* RNA nucleoplasmic accumulation in G2/M cells after exposure to bleomycin. (D) Colocalization between *TLC1* RNA focus and Rfa1-GFP focus in G2/M cells after 30 min of bleomycin exposure. Bar, 1 μ m. (E) Kinetics of colocalization between a *TLC1* RNA focus and a Rfa1-GFP focus in G2/M cells after exposure to bleomycin; n = 200 cells per time point. Error bars represent \pm SD.

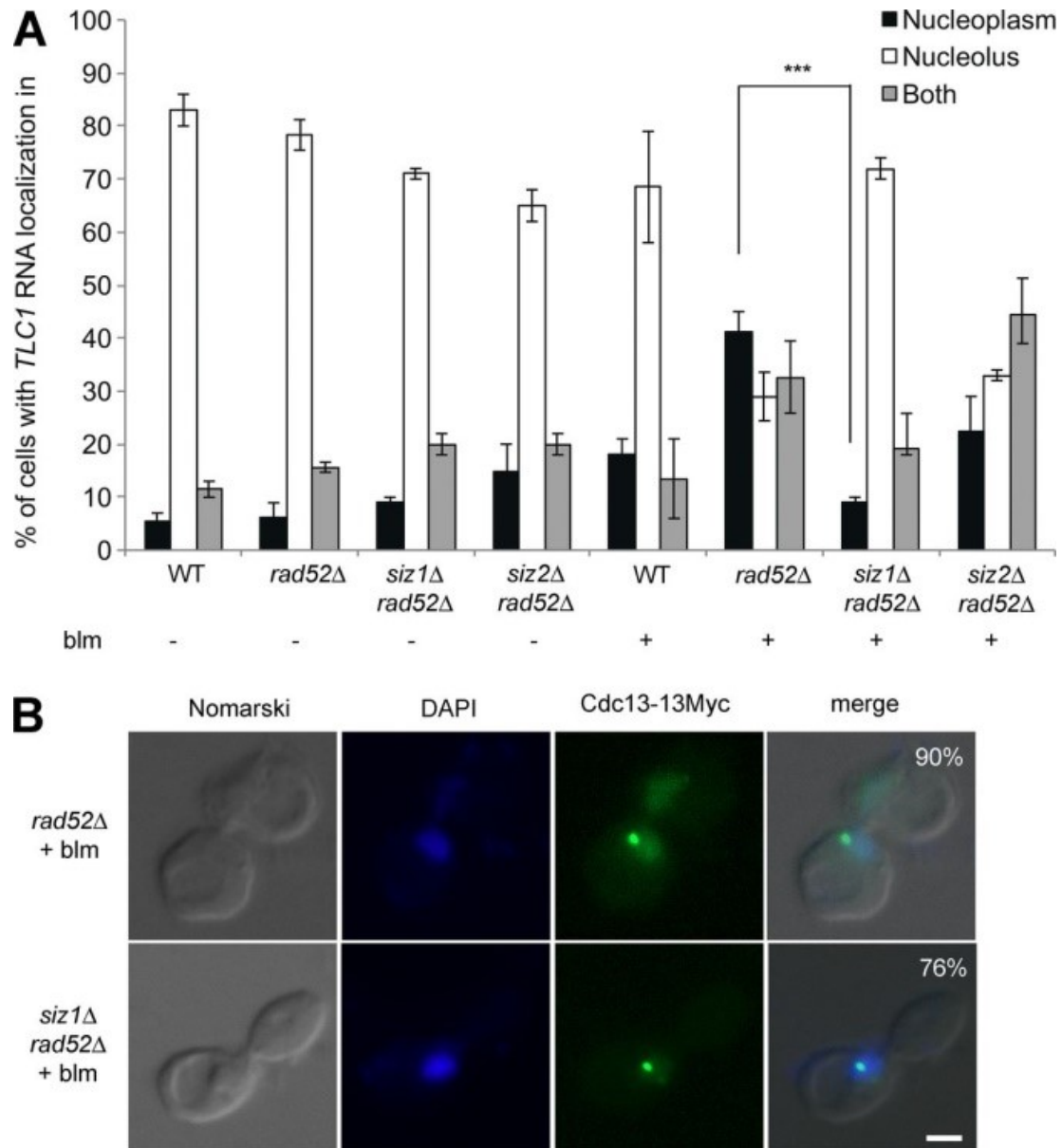


Figure 20. – The E3 SUMO ligase Siz1 is required for the accumulation of *TLC1* RNA in the nucleoplasm of *rad52Δ* cells after DNA damage.

(A) Nuclear distribution of *TLC1* RNA in various single mutants of the E3 SUMO ligases (*siz1Δ* or *siz2Δ*) in *rad52Δ* genetic background with (+) or without (-) exposure to bleomycin (blm); n = 200–300 cells. Error bars represent \pm SD. ***, P < 0.005 (two-tailed t test). (B) Cdc13 clusters are still formed in the *siz1Δ rad52Δ* strain after DNA damage. Immunofluorescence (IF) analysis of Cdc13-myc was conducted in *rad52Δ* and *siz1Δ rad52Δ* cells after bleomycin (blm) treatment. Bar, 1 μ m; n = 200 cells.

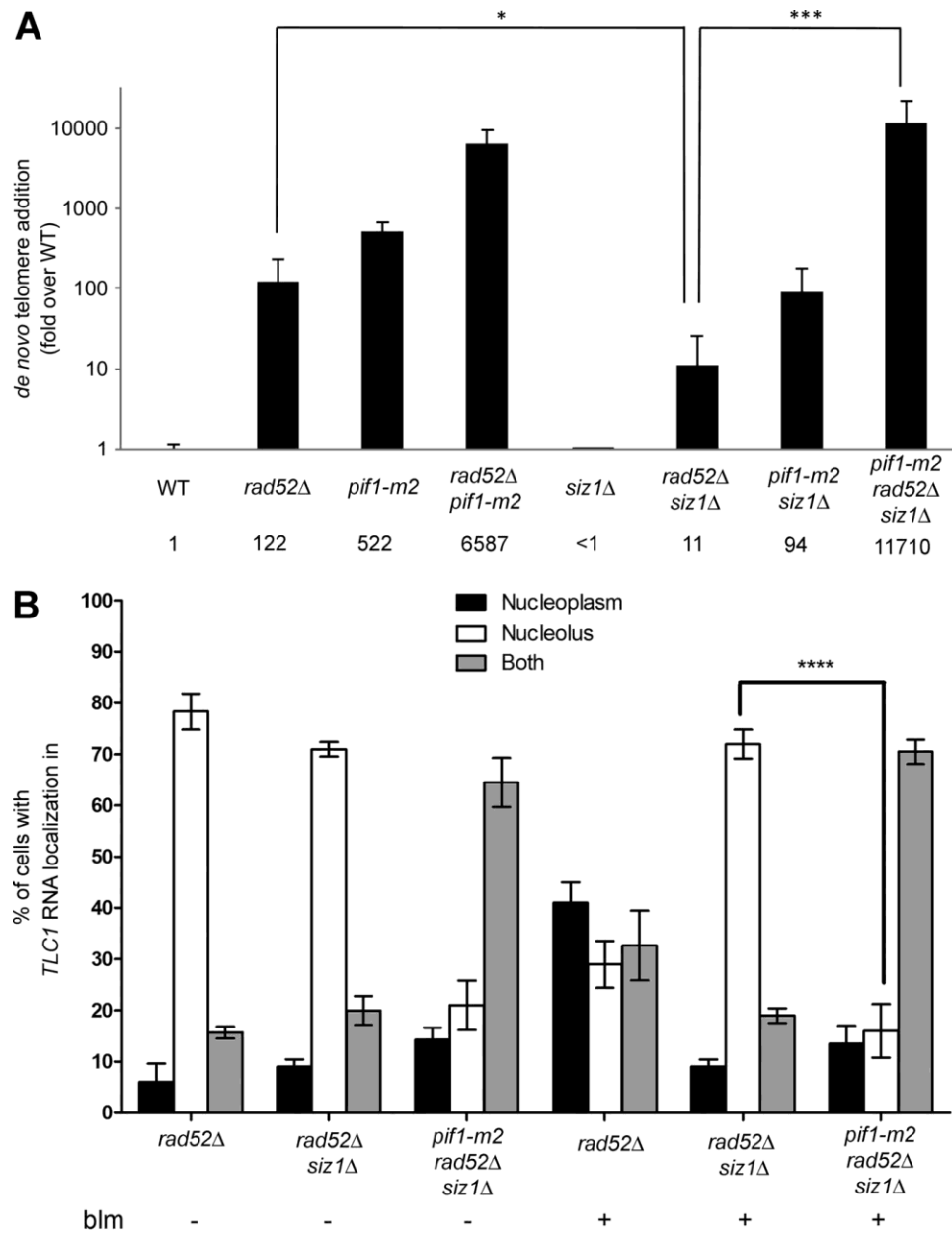


Figure 21. – Siz1 promotes de novo telomere addition in *rad52Δ* cells.

(A) Quantification of de novo telomere addition events. Values are reported as fold over wild-type (WT). $n = 9\text{--}34$ cultures. Error bars represent $\pm 95\%$ confidence interval. *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.005$ (Mann–Whitney t test). (B) The *pif1-m2* mutant reduces the nucleolar accumulation of *TLC1* RNA in *rad52Δ siz1Δ* cells. Nuclear distribution of *TLC1* RNA in *rad52Δ*, *siz1Δ rad52Δ*, and *pif1-m2 siz1Δ rad52Δ* cells, with (+) or without (–) exposure to bleomycin (blm). Error bars represent \pm SD; $n = 200\text{--}300$ cells. ****, $P < 0.0001$ (two-tailed t test).

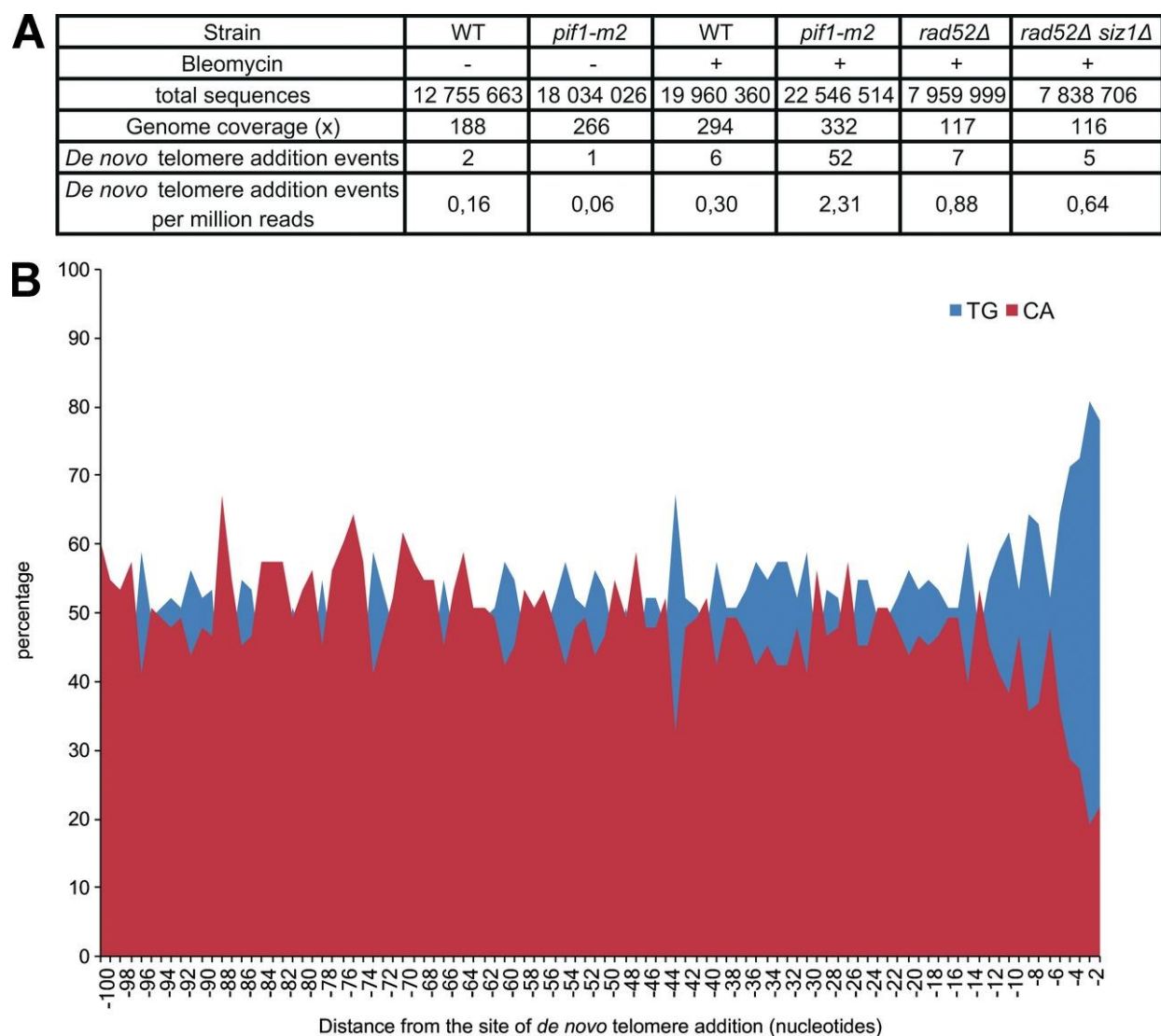


Figure 22. – Identification of telomere healing events in bleomycin-treated cells.

(A) Analysis of reads containing *de novo* telomere events. (B) Percentage of T+G (blue) and C+A (red) nucleotides at each position within the 100 nt upstream of the site of *de novo* telomere addition.

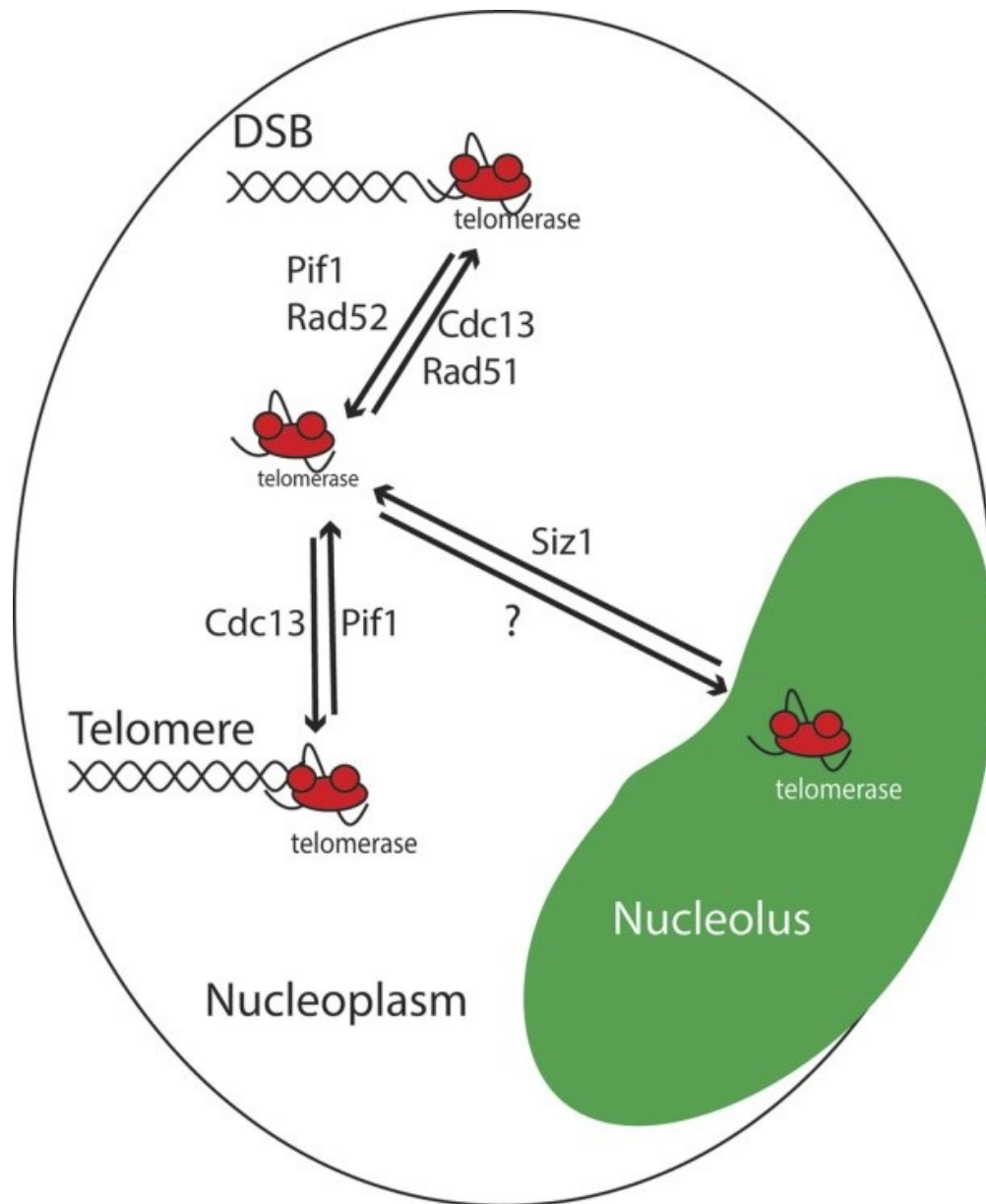


Figure 23. – Model for telomerase trafficking in G2/M and at DNA damage sites.

In the nucleoplasm, Pif1 activity removes telomerase from telomeres and promotes its accumulation in the nucleolus via an unknown mechanism. In the presence of DSBs, Pif1, and Rad52 inhibit the accumulation of telomerase and Cdc13, respectively, at break sites, leading to the accumulation of telomerase in the nucleolus and a reduction in de novo telomere addition. In the presence of DSBs, Siz1 is required for telomerase trafficking out of the nucleolus and for de novo telomere addition in *rad52Δ* cells.

2.3.8. Supplementary materials

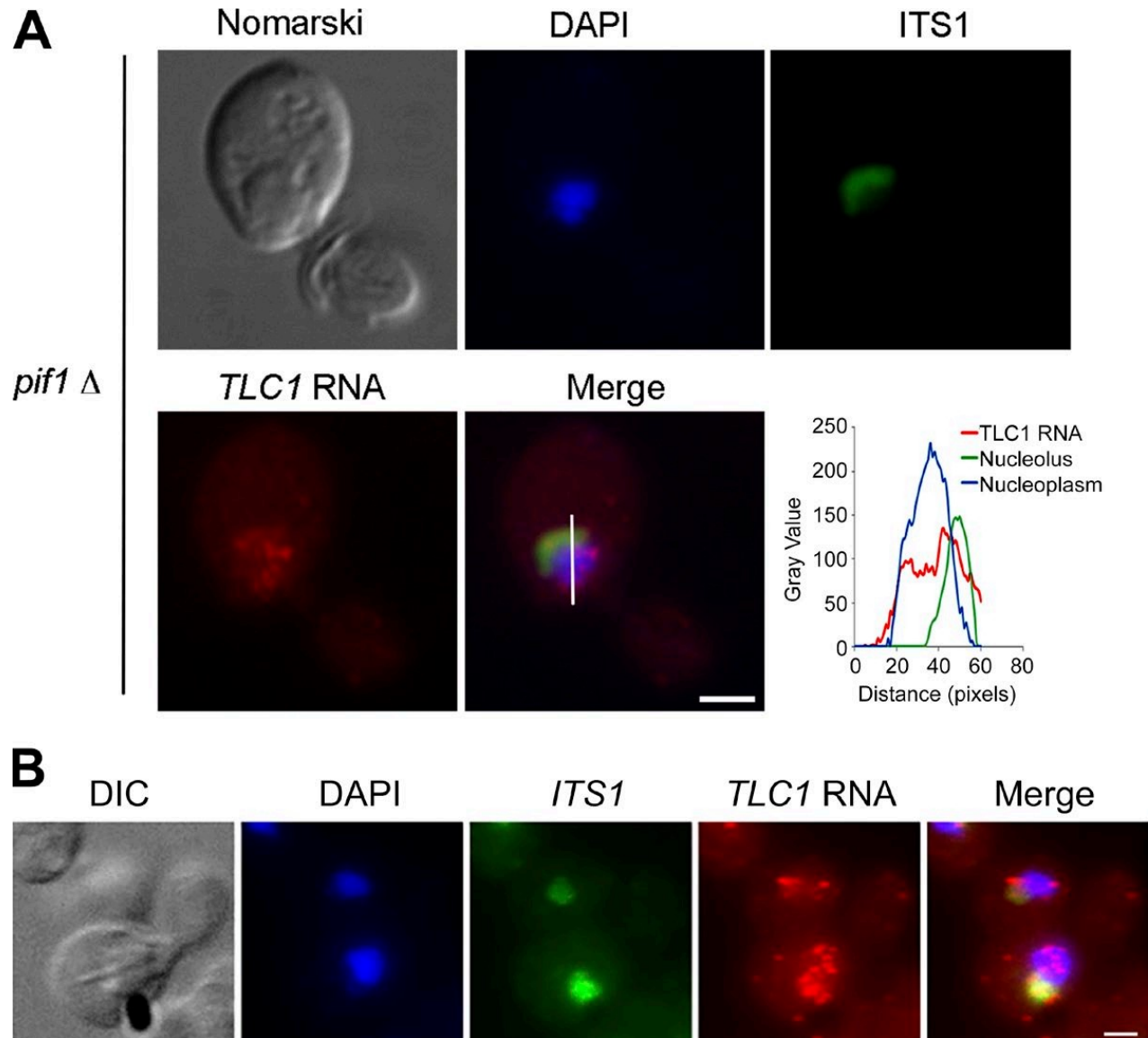


Figure S1. — *TLC1* RNA localization in *pif1* Δ and *pif1-m2* strains.

(A) Image and line scan analysis of *TLC1* RNA, *ITS1* probe and DAPI of a *pif1* Δ cell in G2. Bar, 1 μ m. (B) Distribution of *TLC1* RNA in a *pif1-m2* yeast cell in G2. Bar, 1 μ m.

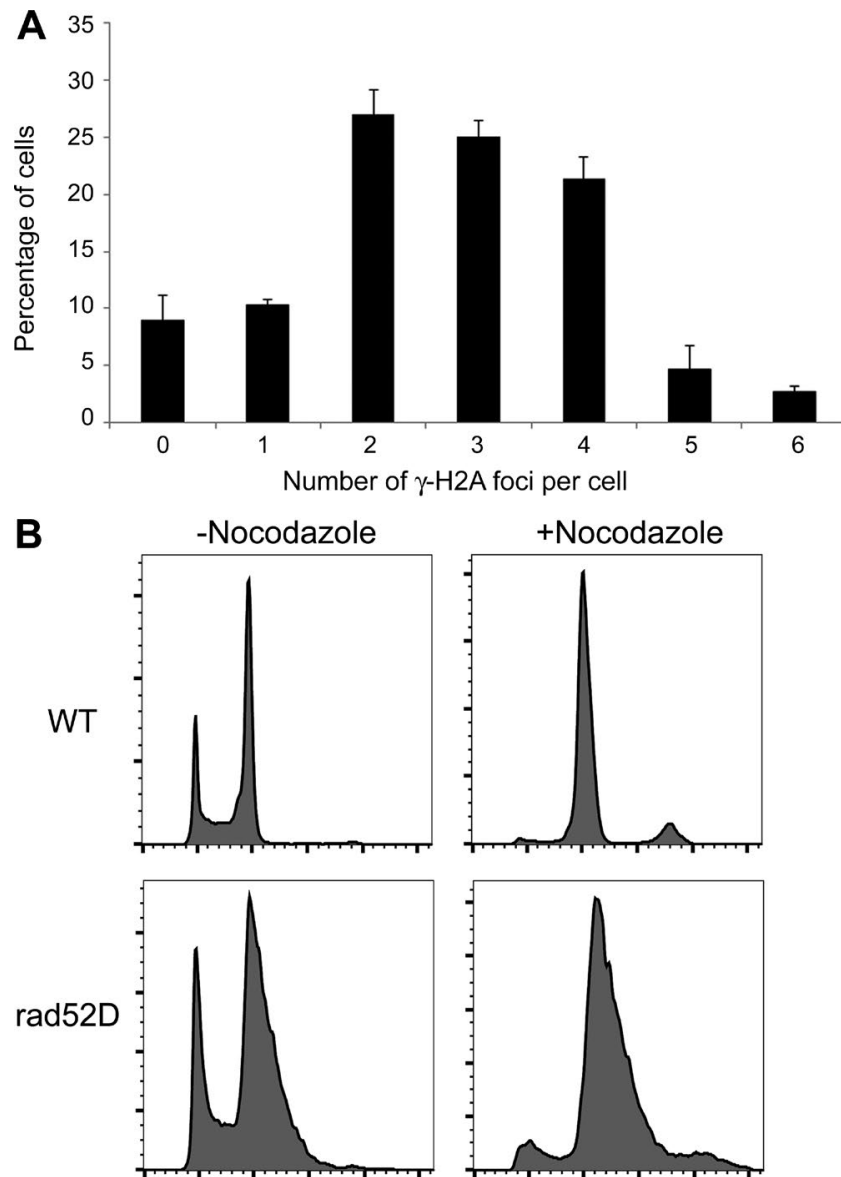


Figure S2. – Validation of bleomycin and nocodazole treatments of yeast cells.

(A) Quantification of the number of γ -H2A foci per cell in the yeast population after treatment with bleomycin; $n = 300$ cells. Error bars represent \pm SD. (B) Cell cycle synchronization of WT or *rad52 Δ* cells treated with nocodazole.

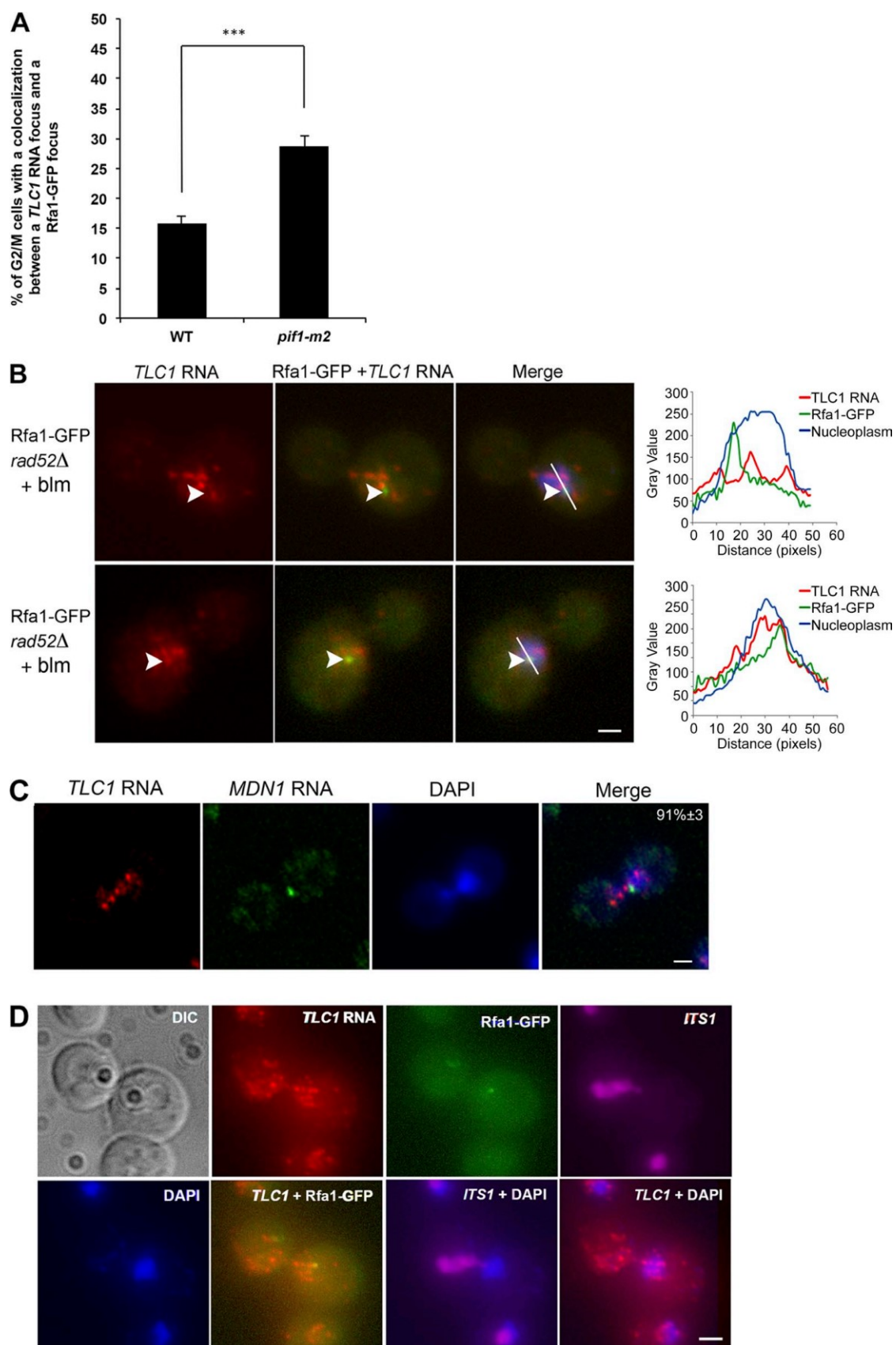


Figure S3. – Analysis of *TLC1* RNA colocalization with double-strand breaks.

(A) Quantification of colocalization events between *TLC1* RNA foci and Rfa1-GFP foci in WT and *pif1-m2* strains; n = 45–63 cells. Error bars correspond to \pm SD. ***, P < 0.005 (two-tailed t test).

(B) Linescan analysis of *TLC1* RNA, Rfa1-GFP and DAPI colocalization in the nucleus of *rad52* Δ cells. Arrowheads mark a Rfa1-GFP focus that does not colocalize (top) or colocalizes (bottom) with a *TLC1* RNA focus.

(C) Quantification of *TLC1* RNA foci colocalization with a nuclear *MDN1* transcription site in G2/M cells. FISH against *TLC1* RNA and *MDN1* RNA in *rad52* Δ cells treated with bleomycin. Number represents the percentage of G2/M cells without colocalization between a *TLC1* RNA focus (red) and the *MDN1* transcription site focus (green).

(D) Maximum intensity projection of *rad52* Δ yeast cell to show distribution of *TLC1* RNA foci, Rfa1-GFP focus, nucleolus (*ITS1*), and nucleoplasm (DAPI). Bars, 1 μ m.

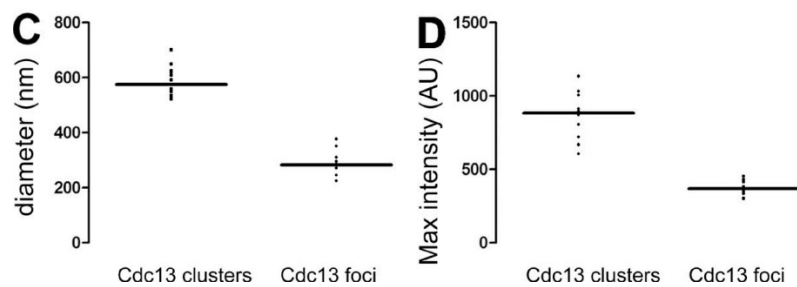
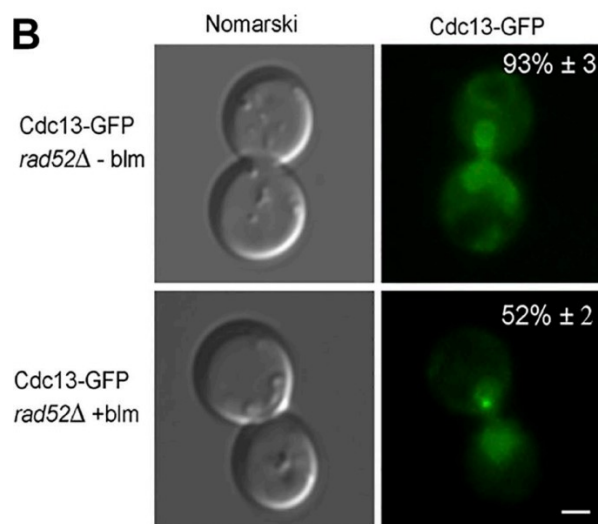
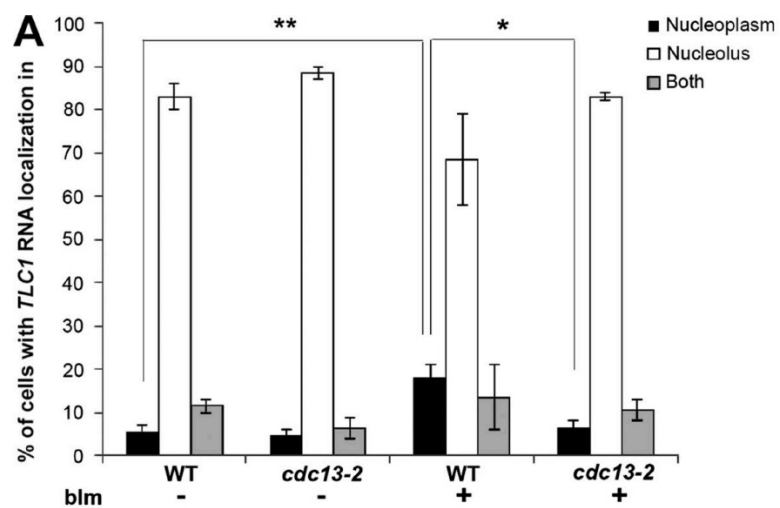


Figure S4. – Quantitative analysis of Cdc13 foci and clusters after induction of DNA damage.

(A) *TLC1* RNA localization in WT and *cdc13-2* strains before and after bleomycin treatment; n = 300 cells. Error bars correspond to \pm SD. *, P < 0.05; **, P < 0.01 (two-tailed t test). (B) Formation of Cdc13-GFP foci in living yeast cells with DNA damage. Cdc13-GFP *rad52* Δ cells were treated or not with bleomycin. Quantification of each phenotype in the yeast cell population is indicated in both panels on the right. Bar, 1 μ m. (C) Mean diameter of Cdc13 foci and clusters. The dot plot shows the distribution of the diameter of 10 Cdc13 foci and 13 Cdc13 clusters. Cdc13 foci have a mean diameter of 283 nm, whereas Cdc13 clusters have a mean diameter of 575 nm. (D) Mean maximal fluorescence intensities of Cdc13 foci and clusters. The dot plot shows the distribution of the maximal fluorescence intensities of 10 Cdc13 foci and 13 Cdc13 clusters. Cdc13 foci have a mean maximal fluorescence intensity of 355 arbitrary fluorescence units (AUs), whereas clusters have a mean maximal fluorescence intensity of 883 AUs.

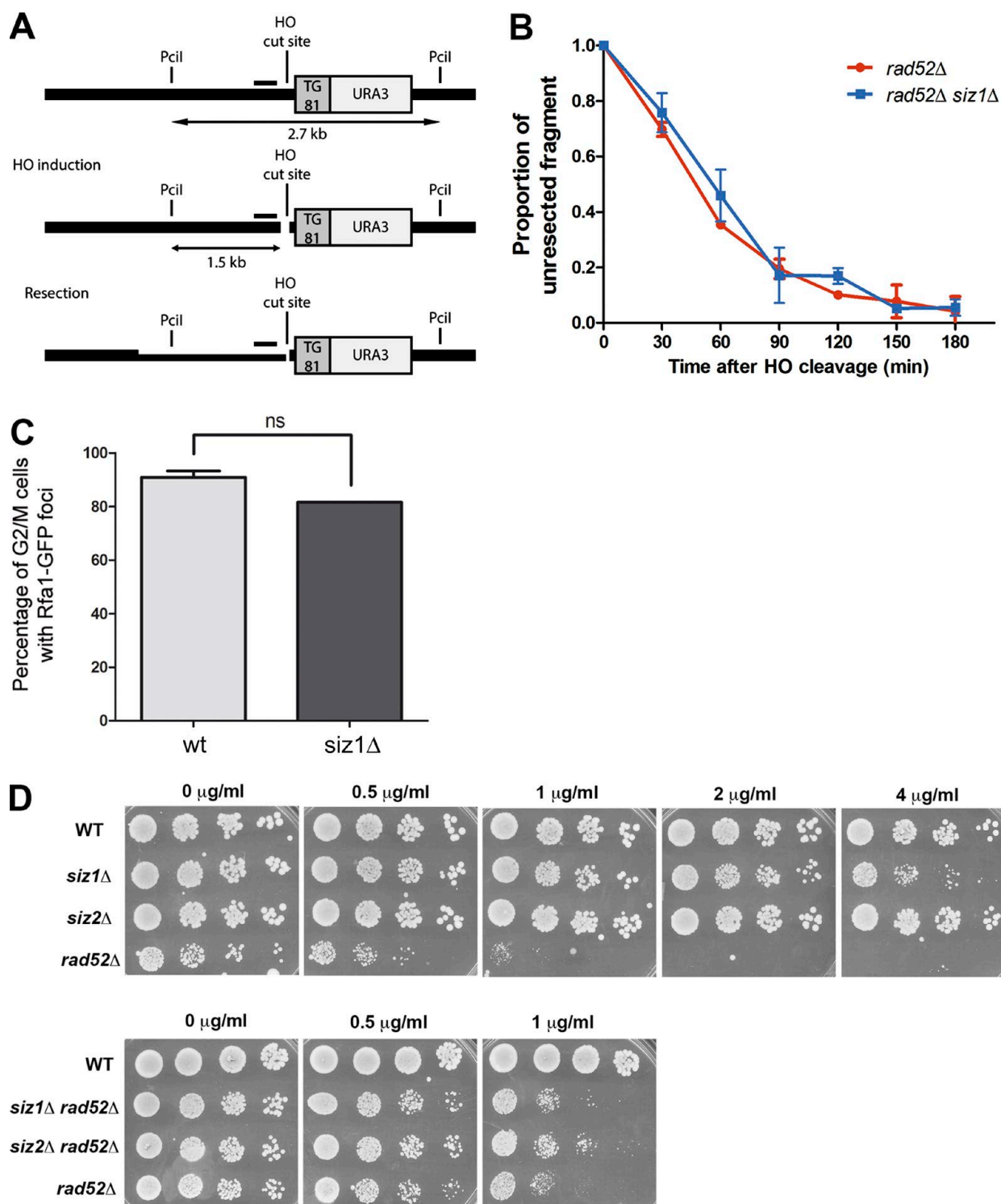


Figure S5. – Siz1 is not involved in the resection of DSBs.

(A) Schematic representation of the HO-TG81-URA3 locus used to assess resection of the HO induced DSB. Notice that the resection is measured on the fragment without TG81 repeats. 5'–3' degradation eliminates the PciI site, which results in the disappearance of the 1.5-kb fragment generated by the PciI/HO cut site. Horizontal bars indicate the position of the probe used for Southern blotting to detect the 2.7-kb and 1.5-kb fragments. (B) Kinetic of HO cut resection in *rad52Δ* and *rad52Δ siz1Δ* strains. Means from two to three independent experiments are presented. Error bars correspond to \pm SD. (C) Quantification of resected DSBs marker Rfa1-GFP foci in G2/M cells from WT and *siz1Δ* strain treated with bleomycin. ns, not significant. n = 217–226 cells. Error bars correspond to \pm SD. (D, top) Growth assay of *siz1Δ*, *siz2Δ* or *rad52Δ* cells on plates containing various concentrations of bleomycin. Fivefold serial dilutions were spotted on each plate, from 5×10^{-4} to 10^{-5} cells. (D, bottom) Growth assay of *siz1Δ rad52Δ*, *siz2Δ rad52Δ*, or *rad52Δ* cells on plates containing various concentrations of bleomycin. Fivefold serial dilutions were spotted on each plate, from 5×10^{-3} to 10^{-4} cells. These images are representative of at least four independent experiments.

Table S1. – Yeast strains used in this study

Strains	Genotype	Source
W303	Mat a, ura3-1, leu2-3, his3-11, trp1-1, ade2-1	This study
rad52Δ	Mat a, ura3-1, leu2-3, his3-11, trp1-1, ade2-1, rad52::TRP1	This study
mre11Δ rad52Δ	Mat a, ura3-1, leu2-3, his3-11, trp1-1, ade2-1, mre11::KAN rad52::TRP1	This study
xrs2Δ rad52Δ	Mat a, ura3-1, leu2-3, his3-11, trp1-1, ade2-1, xrs2::KAN rad52::TRP1	This study
tel1Δ rad52Δ	Mat a, ura3-1, leu2-3, his3-11, trp1-1, ade2-1, tel1::KAN rad52::TRP1	This study
sml1Δ rad52Δ	Mat a, ura3-1, leu2-3, his3-11, trp1-1, ade2-1, sml1::KAN rad52::TRP1	This study
sml1Δ rad52Δ mec1Δ	Mat a, ura3-1, leu2-3, his3-11, trp1-1, ade2-1, sml1 mec1::KAN rad52::TRP1	This study
rad51Δ	Mat a, ura3-1, leu2-3, his3-11, trp1-1, ade2-1, rad51::TRP1	This study
Rfa1-GFP	Mata, ura3-1, leu2-3, his3-11, trp1-1, ade2-1, RFA1-GFP::KAN	This study
Rfa1-GFP rad52Δ	Mata, ura3-1, leu2-3, his3-11, trp1-1, ade2-1, RFA1-GFP::KAN, rad52::TRP1	This study
Rfa1-GFP siz1Δ	Mata, ura3-1, leu2-3, his3-11, trp1-1, ade2-1, RFA1-GFP::TRP1, siz1::KAN	This study
Cdc13-GFP rad52Δ	Mat a, ura3-1, leu2-3, his3-11, trp1-1, ade2-1, CDC13-GFP::KAN rad52::TRP1	This study
Cdc13-GFP Rfa1-mCherry rad52Δ	Mat a, ura3-1, leu2-3, his3-11, trp1-1, ade2-1, CDC13-GFP::KAN RFA1-mCherry::TRP1 rad52::hygro	This study
Cdc13-myc rad52Δ	Mat a, ura3-1, leu2-3, his3-11, trp1-1, ade2-1, CDC13-13Myc rad52:: TRP1	This study
Cdc13-myc siz1Δ rad52Δ	Mat a, ura3-1, leu2-3, his3-11, trp1-1, ade2-1, siz1::TRP1, CDC13-13Myc::KAN rad52::HYGRO	This study
Cdc13-myc rad51Δ	Mat a, ura3-1, leu2-3, his3-11, trp1-1, ade2-1, CDC13-13Myc rad51:: TRP1	This study
DVL162	MAT a ura3-52 ade2-101, trp1Δ-1, his3-Δ200 leu2-Δ1cdc13-Δ::LYS2CF-SUP11-TRP1/pVL 438)	V. Lundblad (Salk Institute, San Diego, CA)
DVL162 rad52Δ	MAT a ura3-52 ade2-101, trp1Δ-1, his3-Δ200 leu2-Δ1cdc13-Δ::LYS2CF-SUP11-TRP1 rad52::KAN	This study
JC1323	Mat a, ura3-1, leu2-3 leu2-112 Rad5+, his3-11 his3-15, trp1-1, ade2-, siz1::TRP1; can1-100;	J. Cobb (University of Calgary, Calgary, Canada)
JC1323 rad52Δ	Mat a, ura3-1, leu2-3 leu2-112 Rad5+, his3-11 his3-15, trp1-1, ade2-, siz1::TRP1; can1-100; rad52::HYGRO	This study
JC1322	Mat a, ura3-1, leu2-3 leu2-112 Rad5+, his3-11 his3-15, trp1-1, ade2-, siz2::HIS3; can1-100	J.Cobb
JC1322 rad52Δ	Mat a, ura3-1, leu2-3 leu2-112 Rad5+, his3-11 his3-15, trp1-1, ade2-, siz2::HIS3; can1-100; rad52::HYGRO	This study
RDKY3615	MATa ura3-52 leu2Δ1 trp1Δ63 his3Δ200 lys2ΔBgl hom3-10 ade2Δ1 ade8 hxt13::URA3	R. Kolodner (Ludwig Institute for Cancer Research, San Diego, CA)
RDKY4343	MATa ura3::KAN leu2Δ1 trp1Δ63 his3Δ200 lys2ΔBgl hom3-10 ade2Δ1 ade8 hxt13::URA3 pif1-m2	R. Kolodner
RDKY3615 rad52Δ	RDKY3615 rad52::TRP1	This study
RDKY3615 siz1Δ	RDKY3615 siz1::HYGRO	This study
RDKY3615 rad52Δ siz1Δ	RDKY3615 rad52::TRP1 siz1::HYGRO	This study
RDKY3615 Rfa1-GFP	RDKY3615 RFA1-GFP::TRP1	This study

RDKY4343 rad52Δ	RDKY4343 rad52::TRP1	This study
RDKY4343 siz1Δ	RDKY4343 siz1::HYGRO	This study
RDKY4343 siz1Δ rad52Δ	RDKY4343 siz1::HYGRO rad52::TRP1	This study
RDKY4343 Rfa1-GFP	RDKY4343 RFA1-GFP::TRP1	This study
RDKY4343 Rfa1-GFP rad52Δ	RDKY4343 RFA1-GFP::TRP1 rad52::HYGRO	This study
B365-17A	Mat trp1-1 can1-100 ura3-1 leu2-3,112 ade2::hisG-URA3-his3—ade2-5'Δ--TRP1—ade2-n-his3 rad51::HIS3 rad52::TRP1	L. Symington (Columbia University, New York, NY)
B365-7A	Mat trp1-1 can1-100 ura3-1 leu2-3,112 ade2::hisG his3- ade2-5'Δ--TRP1—ade2-n-his3 rad51::HIS3	L. Symington
B365-9A	MatA trp1-1 can1-100 ura3-1 leu2-3,112 ade2::hisG his3- ade2-5'Δ--TRP1—ade2-n-his3 rad52::TRP1	L. Symington
DDY2472	S288C GAL-HO (leu) URA3-TG81-HOcs-LYS2 rad52::his	D. Durocher (Lunenfeld-Tanenbaum Research Institute, Toronto, Canada)
DDY2472 siz1Δ	DDY2472 siz1::KAN	This study

Table S2. – Statistical analysis of Fig. 4 B (nucleoplasmic localization of TLC1 RNA)

Strain	P-value
rad52Δ versus rad52Δ mre11Δ	0.0002
rad52Δ versus rad52Δ xrs2Δ	0.0001
rad52Δ versus rad52Δ tel1Δ	0.0002
rad52Δ versus rad52Δ sml1Δ	Not significant
rad52Δ versus rad52Δ sml1Δ mec1Δ	0.02
rad52Δ sml1Δ versus rad52Δ sml1Δ mec1Δ	0.13
rad52Δ versus rad52Δ cdc13-2	0.0013

Table S3. – List of all de novo telomere additions found with the Illumina sequencing approach

Provided online is Table S3 in Excel, which lists all de novo telomere additions, found with the Illumina sequencing approach. (<http://bit.ly/39lpXC3>)

3. Article 2 – Induction et relocalisation des ARN contenant des répétitions télomériques durant la transition diauxique chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*

Induction and Relocalization of Telomeric Repeat-Containing RNAs During Diauxic Shift in Budding Yeast

Auteurs : Carmina Angelica Perez-Romero^{1,2,3,*}, Maxime Lalonde^{1,*}, Pascal Chartrand¹, Emilio Cusanelli⁴

1 Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Université de Montréal, Montréal, QC, H3C 3J7, Canada.

2 Department of Biochemistry, McMaster University, Ontario, Canada.

3 UMR3664, Institut Curie, Paris, France.

4 Center for Integrative Biology (CIBIO), University of Trento, Trento, Italy.
emilio.cusanelli@unitn.it.

* contribution équivalente

Publié dans : Current Genetics, vol.64, pp. 117-1127, 2018. doi: 10.1007/s00294-018-0829-5

3.1. Mise en contexte

Cet article avait pour but d'étudier l'expression de l'ARN télomérique TERRA dans les différentes phases de croissance des levures en combinant des approches de microscopie et de biologie moléculaire (179)(annexe 2). L'expression de TERRA chez *Saccharomyces cerevisiae* est maintenue à un niveau très bas grâce à l'inhibition de sa transcription et à sa dégradation active. Lorsque les télomères sont courts, l'expression de TERRA augmente et celui-ci joue un rôle dans le recrutement de la télomérase aux télomères courts. Il est également connu que la perturbation des niveaux de TERRA peut entraîner, entre autres, des problèmes au niveau de la réplication des télomères, des problèmes de régulation de la taille des télomères et de la recombinaison entre télomères. Il existe peu de données sur les conditions cellulaires, à l'extérieur du raccourcissement des télomères, qui régulent l'expression de TERRA. En utilisant des approches de microscopie en cellules vivantes, de FISH et de RT-qPCR, nous avons étudié comment les différentes phases de croissance en culture influencent l'expression et la localisation de TERRA chez la levure. Nos résultats montrent un lien entre le métabolisme, le stress oxydatif, et l'expression et la localisation de TERRA.

3.2. Contribution des auteurs

Tous les auteurs ont participé à la conception des expériences. Pascal Chartrand et Emilio Cusanelli ont effectué la rédaction de l'article. Carmina A. Perez-Romero a effectué les expériences de FISH et d'imagerie en cellules vivantes. J'ai procédé aux expériences de RT-qPCR et de demi-vie des ARN. Emilio Cusanelli a effectué une partie des expériences d'imagerie en cellules vivantes et l'immunobuvardage de type Southern.

3.3. Texte de l'article

3.3.1. Abstract

Telomeres are maintained in a heterochromatic state that represses transcription of subtelomeric genes, a phenomenon known as telomere position effect. Nevertheless, telomeric DNA is actively transcribed, leading to the synthesis of telomeric repeat-containing noncoding RNA or TERRA. This nuclear noncoding RNA has been proposed to play important roles at telomeres, regulating their silencing, capping, repair and elongation by telomerase. In the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, TERRA accumulation is repressed by telomeric silencing and the Rat1 exonuclease. On the other hand, telomere shortening promotes expression of TERRA. So far, little is known about the biological processes that induce TERRA expression in yeast. Understanding the dynamics of TERRA expression and localization is essential to define its function in telomere biology. Here, we aim to study the dynamics of TERRA expression during yeast cell growth. Using live-cell imaging, RNA-FISH and quantitative RT-PCR, we show that TERRA expression is induced as yeast cells undergo diauxic shift, a lag phase during which yeast cells switch their metabolism from anaerobic fermentation to oxidative respiration. This induction is transient as TERRA levels decrease during post-diauxic shift. The increased expression of TERRA is not due to the shortening of telomeres or increased stability of this transcript. Surprisingly, this induction is coincident with a cytoplasmic accumulation of TERRA molecules. Our results suggest that TERRA transcripts may play extranuclear functions with important implications in telomere biology and add a novel layer of complexity in the interplay between telomere biology, metabolism and stress response.

3.3.2. Introduction

Despite their constitutive heterochromatic state, telomeres are transcribed by RNA polymerase II giving rise to a class of long noncoding RNA called TERRA (telomeric repeat-containing RNA) (156, 157). TERRA molecules localize at telomeres where they exert key functions including regulation of heterochromatin formation (456) and DNA replication (457). Furthermore, TERRA molecules play important extratelomeric functions by regulating gene expression through interaction with TERRA-binding sites within the genome (170). Interestingly, a fraction of TERRA is exported outside the cells through exosome vesicles to promote inflammatory response in mammalian cells (458). These findings indicate that TERRA molecules undergo complex dynamics within cells which are essential to TERRA's functions. The aim of the present study is to define the dynamics of TERRA molecules during yeast cell growth. Using live-cell imaging and biochemical approaches, we show that the expression and localization of TERRA is tightly regulated during yeast cell growth and that TERRA undergoes transient induction and relocalization to the cytoplasm during diauxic shift, when the cells switch their metabolism from fermentative glycolysis to oxidative respiration in response to glucose exhaustion (459). Our results suggest that TERRA transcripts may play a role in the transition from exponential to post-diauxic growth or in the response to the consequent oxidative stress.

Telomeres are nucleoprotein structures assembled at the ends of eukaryotic chromosomes protecting them from degradation and erroneous recombination events (460, 461). Telomeric DNA consists of a variable number of telomeric repeats followed by a single-stranded G-rich 3' overhang. The telomeric repeats are bound by specific telomere-binding proteins, forming the "shelterin" complex in mammals, which mediate telomere functions and are essential to telomere length homeostasis (462-464). In addition, telomeres are transcribed giving rise to a long noncoding RNA called TERRA, which plays key roles in telomere biology (161). In particular, TERRA transcripts have been proposed to promote heterochromatin formation at chromosome ends (456) and regulate the proper assembly of telomere-binding proteins to telomeric DNA (465), also known as telomere capping. Furthermore, TERRA levels increase during telomere dysfunction and induced TERRA expression can sustain the DNA

damage response triggered by dysfunctional telomeres (466, 467). On the other hand, in telomerase-positive yeast cells, TERRA transcripts have been proposed to act as scaffold molecules to promote telomerase clustering during S phase (168). In line with this evidence, short telomeres induce TERRA expression as they are elongated by telomerase in both budding and fission yeast cells (163, 168). Importantly, it has been recently shown that TERRA molecules exert critical extra-telomeric activities as they regulate widespread gene expression through their interaction with multiple genomic loci in mouse cells (170).

TERRA is expressed in a variety of organisms, including yeasts, zebrafish, mouse and human, indicating a high degree of conservation (468). TERRA transcription starts from the subtelomeric regions of chromosomes and proceeds towards the chromosome end terminating within the telomeric repeat tract. For this reason, TERRA transcripts contain both subtelomeric-derived sequences and telomeric repeats (161). In budding yeast, TERRA levels are low due to the activity of the nuclear 5'-3' RNA exonuclease Rat1 which actively degrades TERRA transcripts (159). Furthermore, TERRA repression is regulated by the telomere-binding proteins Sir2/3/4 and Rif1, which inhibit TERRA expression at the transcriptional level or by promoting Rat1 activity at telomeres (165, 166). Finally, the RNA pol II-associated PAF1 complex also controls TERRA levels at telomeres (164).

While the repression of TERRA transcription has been well studied, the biological conditions that promote TERRA expression are still poorly known, especially in budding yeast. To explore this question, in the current study we used biochemical and cytological approaches to investigate the expression and localization of TERRA transcripts during yeast cell growth. In particular, using live-cell imaging, RNA fluorescent in situ hybridization (FISH) and quantitative RT-PCR, we observed that TERRA expression from both X core and Y' telomeres increases as yeast cells undergo diauxic shift. This induction is transient as TERRA levels decrease during post-diauxic shift. The increased expression of TERRA during diauxic shift is not due to the shortening of telomeres or increased half-life of TERRA transcripts. Surprisingly, this induction is coincident with a cytoplasmic accumulation of TERRA molecules, unlike what we observed in yeast cells growing in log phase. The diauxic shift is characterized by a reprogramming of gene expression that enables the cells to transit from the anaerobic fermentation of glucose to the

oxidative respiration and to defend themselves against the oxidative stress resulting from the respiratory metabolism (398, 459, 469). Our results suggest that TERRA transcripts play a role during the shift from glucose fermentation to oxidative metabolism in budding yeast.

3.3.3. Materials and methods

3.3.3.1. Yeast strains and growth conditions

All the strains used in this study were generated in FY23 background as previously described (168) (see Table 1). For the time course experiments, a single colony of the indicated strains was picked from a fresh agar plate and grown overnight at 30°C in 10 ml of liquid medium. The WT strain was grown in YP medium supplemented with 2% glucose. The TERRA–MS2 clones were grown in synthetic (SD medium) supplemented with 2% glucose and appropriate amino acids. The time course experiments were initiated upon dilution of the overnight cultures to OD₆₀₀ 0.2. The cultures were then grown continuously at 30°C shaking without medium changes. Cells were collected every 2–3 h until reaching the diauxic shift phase, and then every 12–24 h, until reaching the stationary phase. At each time point, OD₆₀₀ of the yeast culture was assessed. Collected cells were then processed for microscopy analyses as well as RNA and DNA extraction, as described below. For the glucose starvation experiments, upon dilution of the overnight culture to OD₆₀₀ 0.2, as indicated above, cells were grown in YP medium supplemented with 2% glucose up to OD₆₀₀ 0.8, at which point the culture was divided into two, pelleted, and resuspended in YP + or – glucose. The resulting two cultures were then grown for 2 h at 30 °C, and then processed for RNA extraction and subsequent RT-qPCR analyses.

3.3.3.2. Live-cell imaging

Live-cell imaging analyses of TERRA–MS2 clones were performed as in (180). Briefly, cells were collected at the indicated time points and imaged using a Zeiss Cell Observer SD spinning disk confocal microscope, equipped with a 100×/1.46 NA objective and an Evolve 512 EM-CCD camera (Photometrics) using a diode laser for GFP (491 nm/50 mW) and ET 525/50 emission filter for analyses of the TERRA–MS2–GFP, and a diode laser for RFP (568 nm/50 mW) and ET 620/60 emission filter for the detection of the Rap1-mCherry. Alternatively, an epi-fluorescence microscope Nikon Eclipse E800, equipped with a 100×/1.46 NA objective and a Evolve 512 EM-CCD camera (Photometrics) was used. In this setting, TERRA–MS2–GFP signal was detected using a FITC filter while the Rap1-mCherry signal was detected using Texas-Red filter. For the quantification analyses of TERRA–MS2–GFP foci during logarithmic, diauxic shift and stationary phase, at least 300 cells were counted at each time point for each strain.

3.3.3.3. RNA-FISH

RNA-FISH experiments on Tel1L and Tel6R TERRA were performed as described in (168) with the following variations. For cells collected during diauxic shift and stationary phases, spheroplasts formation was performed using double amount of the oxalyticase enzyme and in the presence of zymolyase (60 µl of zymolyase 5 µg/ml). Spheroplasting incubation times were the following: 15 min (for log phase cells), 20 min (for diauxic shift cells), and 25 min (for stationary phase cells) at 30°C.

3.3.3.4. RNA extraction and RT-qPCR analyses

Cells were harvested at the indicated time points, washed in ice-cold PBS and resuspended in 400 µl of ice-cold Tris/EDTA/SDS (TES) solution (10 mM Tris pH 7.5, 10 mM EDTA, 0.5% SDS). A total of 400 µl of acid phenol were added to each sample and tubes were incubated for 1 h at 65°C with vortexing for 5 s every 10 min. Samples were then chilled on ice for 5 min and centrifuged at 13,000 rpm for 5 min at room temperature. Samples were further extracted with phenol/chloroform/isoamyl alcohol and, after a chloroform extraction, RNA was precipitated by addition of 1/10 volume of 3 M NaAc (pH 5.2) and 2 volumes of 100% ethanol (ETOH). RNA was subsequently collected by centrifugation and washed with 500 µl of 70% ETOH. Pellets were resuspended in diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated water and run on 1% MOPS agarose gel for quantification and quality control. A total of 10 µg of RNA was treated with 20U of DNase I (Thermo-Fisher) for 4 h at 37°C and then purified using the RNA clean & concentrator kit from ZymoResearch. Then, 1 µg of DNase-treated RNA was reverse transcribed using RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Fisher) at 42 °C for 1 h. For TERRA expression, a mix of 0.5 µmol of a C-rich primer (CACCACACCCACACACCACCCACA) and 0.5 µg of a poly-d(t) primer was used for the reverse transcription reaction (RT). For the subtelomeric genes, only 0.5 µg of a poly-d(t) primer was used. 20 ng of cDNA was used for the qPCR experiments using the qPCR master mix SsoFAST EvaGreen Supermix from Bio-Rad. qPCRs were carried out on a Roche LightCycler96. Expression levels were normalized against the *ALG9* and *TAF10* mRNAs, which expression remains stable independent of growth conditions (470), using the delta Ct method. For the time course experiments, TERRA expression at each time point was normalized with time point t = 2 h, which was set as 1.

3.3.3.5. RNA half-life measurement

For RNA half-life measurements during logarithmic phase, *rpb1-1* cells were grown at 22°C from OD₆₀₀ 0.1 to OD₆₀₀ 0.8 in 150 ml of YP medium supplemented with 2% glucose. Then, 150 ml of pre-warmed (56°C) medium was added and the culture was then grown at 39°C with continuous shaking. Starting from when the pre-warmed medium was added as T = 0, 50 ml samples were collected every 10 min during 1 h, followed by RNA extraction and qPCR analyses. For RNA half-life measurements during diauxic shift, *rpb1-1* cells were grown at 22°C from OD₆₀₀ 0.1 to OD₆₀₀ 16–19. Then, the culture was centrifuged and half of the supernatant was removed and warmed up at 56°C, while the pelleted cells were resuspended in the remaining supernatant. Once the removed half of the supernatant reached 56°C, it was added back to the culture and transferred at 39°C. Starting from when the warmed supernatant was added as T = 0, 2 ml samples were collected every 10 min during 1 h, followed by RNA extraction and qPCR analyses. Induction of TERRA RNA at T = 0 was verified by RT-qPCR to assure that the yeasts were in diauxic shift.

RNA extraction and qPCR analyses were performed as described above with the exception of using the RNA pol III *SCR1* RNA to normalize for TERRA and *ACT1* mRNA expression instead of *TAF10* and *ALG9* mRNA. For the half-life measurements, the following equation was used: $t_{1/2} = \ln 2 / k_{\text{decay}}$, where k_{decay} is the slope of a semilogarithmic plot of RNA concentration as a function of time, as explained in (471).

3.3.3.6. Telomere length analysis by Southern blot

Cells were harvested at the indicated time points and washed in ice-cold PBS. Pellets were resuspended in 200 µl of lysis buffer (0.01M Tris, pH8; 0.1M NaCl; 1 mM EDTA, pH8; 1% SDS; 2% Triton X-100) and transferred to new tubes containing 200 µl of phenol/chloroform and the equivalent of 200 µl of glass beads. Lysis was performed by vortexing samples 10 min at room temperature. After vortexing, 200 µl of TE was added to each tube and samples were centrifuged for 5 min at 13,000 rpm. After one step of chloroform extraction, DNA was precipitated at –20°C for 1 h adding 2 volumes of EtOH 100%. DNA was resuspended in 200 µl RNase A water solution and incubated at least 1 h at 37°C. Genomic DNA was subsequently quantified on agarose gel. For Southern blot analyses, 10 µg of genomic DNA was digested with BglII, run overnight (30 V) in 1% agarose gel, and processed for DNA hybridization. Hybridization was performed using a telomere specific oligonucleotide (probe sequence: CACCACACCCACACACCACCCACA).

3.3.4. Results

3.3.4.1. TERRA expression is induced during diauxic shift in *Saccharomyces cerevisiae*

We previously developed a live-cell imaging assay which enabled us to visualize and study TERRA transcripts expressed from a single telomere in real time by fluorescence microscopy (168, 180). To this aim, we used the MS2–GFP system which relies on the high-affinity binding between a 21 nt-long stem loop MS2 RNA and the MS2 RNA-binding coat protein. We generated strains (TERRA–MS2 strains) containing two or six MS2 sequences integrated at telomeres 1L or 6R, downstream of the TERRA transcription start site. Expression

of the GFP-fused MS2 coat protein enabled us to image single-telomere TERRA transcripts in living cells. Using this approach, we observed that TERRA transcripts expressed from a single telomere accumulate at the periphery of the nucleus, forming a discrete TERRA–MS2–GFP focus in a small population of cells (Fig. 24a) (168).

These results were observed by culturing the TERRA–MS2 clones in synthetic medium (SD) during exponential growth. During these experiments, we noticed that the number of cells expressing TERRA–MS2–GFP foci varied when a yeast culture was grown over logarithmic phase in the original medium. During yeast cell growth, when glucose becomes limiting in the medium, cells transit from the logarithmic phase to diauxic shift, in which they switch their metabolism to catabolize different carbon sources. The diauxic shift coincides with a decreased growth rate and precedes stationary phase (469). Furthermore, the yeast metabolic switch from fermentation to respiration is characterized by changes in gene expression at both mRNA and protein levels which enable the metabolic reprogramming and the response to the consequent oxidative stress. For this reason, we investigated the expression of TERRA throughout the different phases of yeast growth.

To this aim, we performed time course experiments using four different TERRA–MS2 clones grown continuously in synthetic medium. Cells were collected at different time points and the number of TERRA–MS2–GFP foci-expressing cells was assessed by fluorescence microscopy (Fig. 24b). As expected, early in logarithmic phase ($OD_{600} < 1$), we observed between 10–15% of cells expressing TERRA–MS2–GFP foci. However, at later time points, the percentage of TERRA–MS2–GFP-expressing cells progressively decreased. This condition suddenly changed when the cells entered the diauxic shift, between OD_{600} 6–7, when a marked increase in TERRA–MS2–GFP foci from either telomere 1L or 6R was detected in each of the four clones analyzed (Fig. 24b). This condition was transient, with the number of cells expressing TERRA–MS2–GFP foci decreasing when the cells entered the stationary phase ($OD_{600} > 10$). Quantification of cells expressing TERRA–MS2–GFP foci from telomeres 1L and 6R during log phase, diauxic shift (24–48 h in culture), post-diauxic shift (72 h in culture) and stationary phase (96 h in culture) confirmed an accumulation of cells expressing TERRA foci in diauxic shift compared to log phase, followed by a decline in TERRA-expressing cells in post-diauxic and stationary phase (Fig. 24c).

Interestingly, during diauxic shift, multiple TERRA–MS2–GFP foci per cell were detected, differently from cells growing during logarithmic phase which show mainly a single TERRA–MS2–GFP focus within their nucleus. These experiments indicate that the expression of TERRA is regulated during the various phases of yeast cell growth.

To confirm these results, we performed time course experiments using WT yeast cells grown continuously in rich medium (YPD). In rich medium, diauxic shift occurs at higher cell density (OD_{600} 12–16; after 14–18 h of growth), compared to synthetic medium (OD_{600} 5–7, after 15–48 h of growth). Cells were collected at various time points throughout the different phases of growth for OD_{600} measurements and subsequent RNA extraction. Quantitative RT-PCR analyses of TERRA transcripts revealed an increase in TERRA expression levels during diauxic shift as compared to logarithmic phase (Fig. 25). Importantly, increased levels of TERRA correlated with increased levels of expression of *CTT1* and *SDH2*, two genes which are known to be induced during diauxic shift (472) (Figure S6). The induction of TERRA expression was detected from telomeres 1L, 6R, 10R (Fig. 25a) as well as Y' element-containing telomeres (Fig. 25b), indicating that this phenomenon applies to TERRA transcripts expressed from multiple chromosome ends. In line with the results obtained with TERRA–MS2 clones, the induction in TERRA expression was transient with Tel1L, Tel6R, Tel10R and Y' TERRA levels decreasing as the cells proceed through post-diauxic shift (Fig. 25).

Since TERRA is actively degraded by the Rat1 exonuclease, we asked whether the increased levels of TERRA could be due to a stabilization of TERRA transcripts during diauxic shift. To investigate this question, a yeast strain harboring a temperature-sensitive allele of RNA pol II (*rpb1-1*) was used to measure the half-life of TERRA transcripts in log phase and diauxic shift following inhibition of transcription at non-permissive temperature. These experiments revealed that TERRA half-life does not change between logarithmic phase and diauxic shift in yeast (Table 2), suggesting that increased TERRA levels detected during diauxic shift are not due to an increased stability of these transcripts but more likely to an increased transcription.

In budding yeast, as in fission yeast and human cells, TERRA expression is regulated by telomere length (163, 168, 413, 456). In particular, telomere shortening induces TERRA

expression while telomere re-elongation results in decreased TERRA levels. For this reason, we analyzed telomeres length by Southern blot during the various phases of growth: logarithmic, diauxic shift, post-diauxic shift and stationary phase. As shown in Fig. 26, no detectable changes in telomere length were observed during cell growth, indicating that mechanisms independent of telomere length homeostasis are responsible for the regulation of TERRA expression during yeast cell growth.

Since TERRA expression is inhibited by the SIR complex, a reduction of Sir proteins at telomeres during diauxic shift could be associated with increased expression of subtelomeric genes and TERRA (473, 474). Indeed, a partial relocalization of Sir3 from telomeres to other genomic loci during diauxic shift has been recently reported (475). To explore this possibility, we used available microarray datasets to measure the expression of subtelomeric genes within 10 Kb of telomeres during diauxic shift (398). No global increase in expression was observed among the 82 subtelomeric genes during diauxic shift (Fig. 27a), suggesting that SIR-dependent transcriptional repression is maintained in this condition. However, the expression of specific subtelomeric genes may still be modified during diauxic shift. We, therefore, measured the expression of genes within 1Kb of telomeres 1L (*YAL068W-A*), 6R (*YFR057W*) and 15L (*YOL166W-A*), or 5Kb from telomere 6R (*IRC7*), during diauxic shift using quantitative RT-PCR. A more than fivefold induction of *YAL068W-A* and *YOL166W-A* was observed during diauxic shift compared to log phase, while expression of *YFR057W* was increased by only 50% and *IRC7* was strongly repressed (Fig. 27b, c). Interestingly, a similar expression pattern for these genes was observed upon culturing yeast cells under glucose starvation conditions, which recapitulate the diauxic shift triggered when glucose concentrations become limiting in the culture medium (Figure S7). These results suggest a gene-specific up-regulation near telomeric repeats during diauxic shift.

3.3.4.2. TERRA transcripts are exported to the cytoplasm during diauxic shift

In log phase, TERRA transcripts are nuclear and their localization is regulated during the cell cycle, with TERRA molecules preferentially localizing with their telomere of origin during S phase (168). We used the TERRA–MS2 clones to investigate the cellular distribution of TERRA molecules expressed from telomere 1L and telomere 6R in living cells during diauxic shift. Interestingly, microscopy analyses revealed that the majority of TERRA–MS2–GFP foci accumulate within the cytoplasm (Fig. 28a, b). Furthermore, we frequently observed multiple TERRA–MS2–GFP foci per cell, which is consistent with an increase in TERRA levels during diauxic shift, as compared to the logarithmic phase when a single perinuclear TERRA–MS2–GFP focus is detected (Fig. 24a). To confirm these results, we analyzed the localization of TERRA transcripts by RNA fluorescence in situ hybridization experiments (RNA-FISH) using both WT cells and TERRA–MS2 clones grown until diauxic shift phase. In these experiments, we used fluorescently labeled probes designed to specifically recognize TERRA transcripts expressed from telomere 1L (Tel1L-TERRA) and telomere 6R (Tel6R-TERRA). RNA-FISH experiments revealed an increased number of TERRA-expressing cells in diauxic shift compared to cells in logarithmic phase (Fig. 29a, b), which is consistent with live-cell imaging and RT-qPCR data. Consistent with the results obtained using live-cell imaging, a predominantly cytoplasmic accumulation of TERRA transcripts during the diauxic shift was observed by RNA-FISH (Fig. 29c).

3.3.5. Discussion

Our study provides novel insights into the regulation of TERRA expression and localization. We report that TERRA levels oscillate during yeast cell growth and that TERRA expression is induced during diauxic shift. Telomere restriction fragment (TRF) analysis revealed no changes in telomere length during the various phases of yeast growth. Furthermore, we observed no variations in the half-life of TERRA transcripts during logarithmic phase and diauxic shift. These findings indicate that TERRA expression during yeast cell growth is most likely

regulated through transcriptional control. In addition, the induction of TERRA detected during the diauxic shift is transient, which supports a model in which specific transcription factors may be recruited to chromosome ends to promote TERRA expression. Interestingly, putative genes within 1 Kb of telomeres 1L (*YAL068W-A*), 6R (*YFR057W*) and 15L (*YOL166W-A*) are also induced during diauxic shift and glucose starvation. While *YAL068W-A* and *YOL166W-A* have dubious ORFs and are transcribed on the opposite strand from TERRA, *YFR057W* is transcribed toward the telomere 6R end, like TERRA, suggesting that the ends of chromosomes are subject to active transcriptional regulation during diauxic shift. Our findings suggest that TERRA may play a role in the oxidative metabolism or in the response to the oxidative stress. Indeed, in human myotubes, TERRA is induced by the antioxidant transcription factor Nrf1 during endurance exercise (161). Furthermore, a previous study has shown that telomerase deletion in yeast and subsequent telomere shortening induces an up-regulation of oxidative phosphorylation genes and proliferation of mitochondria, a phenomenon similar to diauxic shift (476). Since telomere shortening induces TERRA expression, this raises an intriguing link between telomere biology and oxidative metabolism.

While yeast promoters are generally downregulated during diauxic shift, some specific promoters have been found to be induced during this phase (477). The Msn2/4, Gis1 and Rph1 are transcription factors known to regulate gene expression during the diauxic shift and in response to stress conditions (478, 479). More specifically, Msn2, Gis1 and Rph1 have been shown to play a role in regulating the expression of subtelomeric genes during diauxic shift or upon oxidative stress (409, 479). It will be interesting to investigate the role of these transcription factors in the regulation of TERRA expression in logarithmic phase, as well as diauxic shift phase and upon stress conditions.

Unexpectedly and in stark contrast with the nuclear localization of TERRA during log phase, we observed that TERRA transcripts are predominantly cytoplasmic during diauxic shift. This is different from TERRA overexpression in log phase cells, like in *tlc1Δ* or *rat1-1* mutant strains, which accumulate this lncRNA in the nucleus (168). It will be interesting to investigate whether TERRA RNA molecules localize to mitochondria, stress granules or P-bodies during the diauxic shift to understand their potential function during this phase of yeast growth. Recent

evidence in fission yeast indicates that TERRA expression is increased during quiescence, a condition characterized by reversible block in cell divisions and a global reduction in gene expression (413). Interestingly, in quiescent cells TERRA up-regulation may promote telomere rearrangements through formation of RNA:DNA hybrids at chromosome ends (480, 481), indicating that TERRA can play a key role in telomere biology in non-dividing cells. It will be of particular interest to investigate potential extranuclear functions of TERRA during quiescence and diauxic shift.

3.3.6. Acknowledgments

This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) MOP-89768. CAPR was supported by a CDMC-CREATE fellowship from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). ML is supported by a fellowship from the Fonds de Recherche du Québec-Santé (FRQS). PC holds a Research Chair from the FRQS. EC is supported by a Rita Levi-Montalcini fellowship from the Italian Ministry of Education University and Research (MIUR).

3.3.7. Figures and tables

Table 1. – Yeast strains used in this study

Yeast strains	Genotype	Sources
FY23	Mata <i>ura3-52 trp1-Δ63</i> <i>leu2-Δ1</i>	C. Cole
<i>rpb1-1</i>	Mat <i>ura3-52 rpb1-1</i>	A. Jacobson
FY23 2MS2-Tel1L Rap1-mCherry	Mata <i>ura3-52 trp1-Δ63</i> <i>leu2-Δ1</i> 2MS2::telomere 1L cherry-KAN::Rap1	Cusanelli et al. (2013)
FY23 6MS2-Tel1L Rap1-mCherry	Mata <i>ura3-52 trp1-Δ63</i> <i>leu2-Δ1</i> 6MS2::telomere 1L cherry-KAN::Rap1	Cusanelli et al. (2013)
FY23 2MS2-Tel6R Rap1-mCherry	Mata <i>ura3-52 trp1-Δ63</i> <i>leu2-Δ1</i> 2MS2::telomere 6R cherry-KAN::Rap1	Cusanelli et al. (2013)
FY23 6MS2-Tel6R Rap1-mCherry	Mat A <i>ura 3–52 trp1-Δ63</i> <i>leu2-Δ1</i> 6MS2::telomere 6R cherry-KAN::Rap1	Cusanelli et al. (2013)

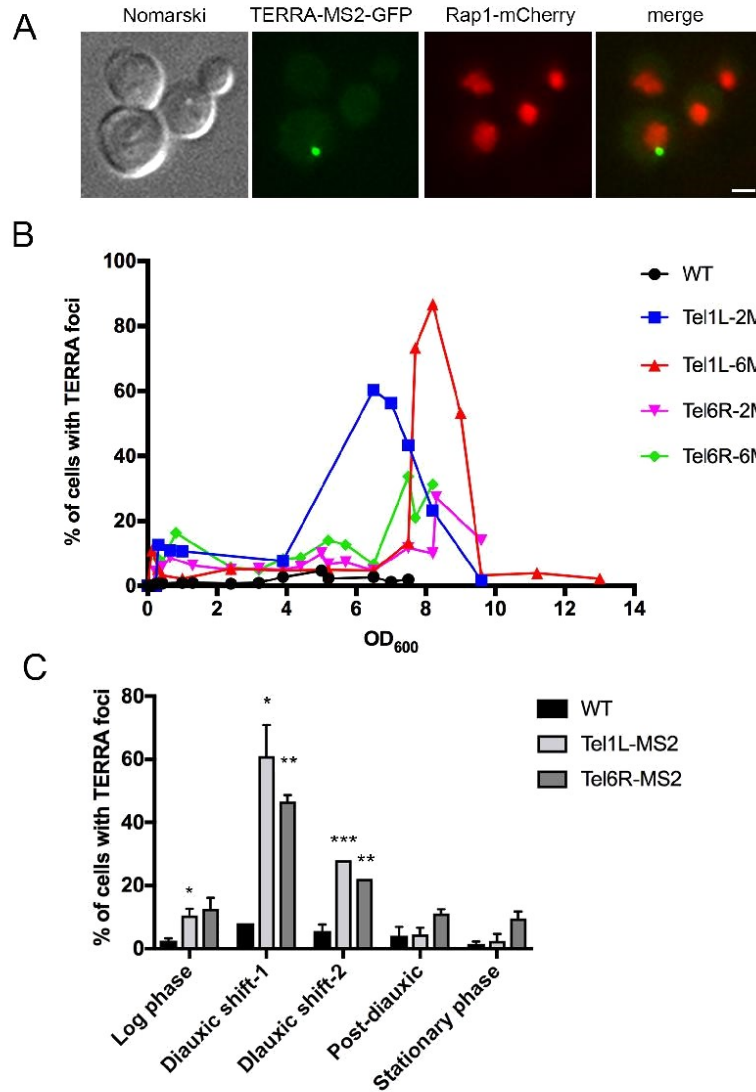


Figure 24. – Accumulation of TERRA during diauxic shift in yeast.

A. Image of a GFP-labeled TERRA–MS2 focus in log phase cell by live-cell microscopy. Rap1-mCherry is used to label the nucleus. Scale bar 1 μ m. B. Time course analysis of 2 \times or 6 \times MS2-tagged Tel1L and Tel6R TERRA clones reveals an increased percentage of cells expressing TERRA during diauxic shift (between OD₆₀₀ 6–10). A WT strain expressing the MS2–GFP fusion protein was used as negative control for non-specific MS2–GFP foci formation. C. Quantification of TERRA foci accumulation during log phase (OD₆₀₀ 0.2–0.4), diauxic shift-1 (+ 24 h) and -2 (+ 48 h), post-diauxic (+ 72 h) and stationary phase (+ 96 h) in the clones expressing Tel1L-MS2 TERRA or Tel6R-MS2 TERRA. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.005

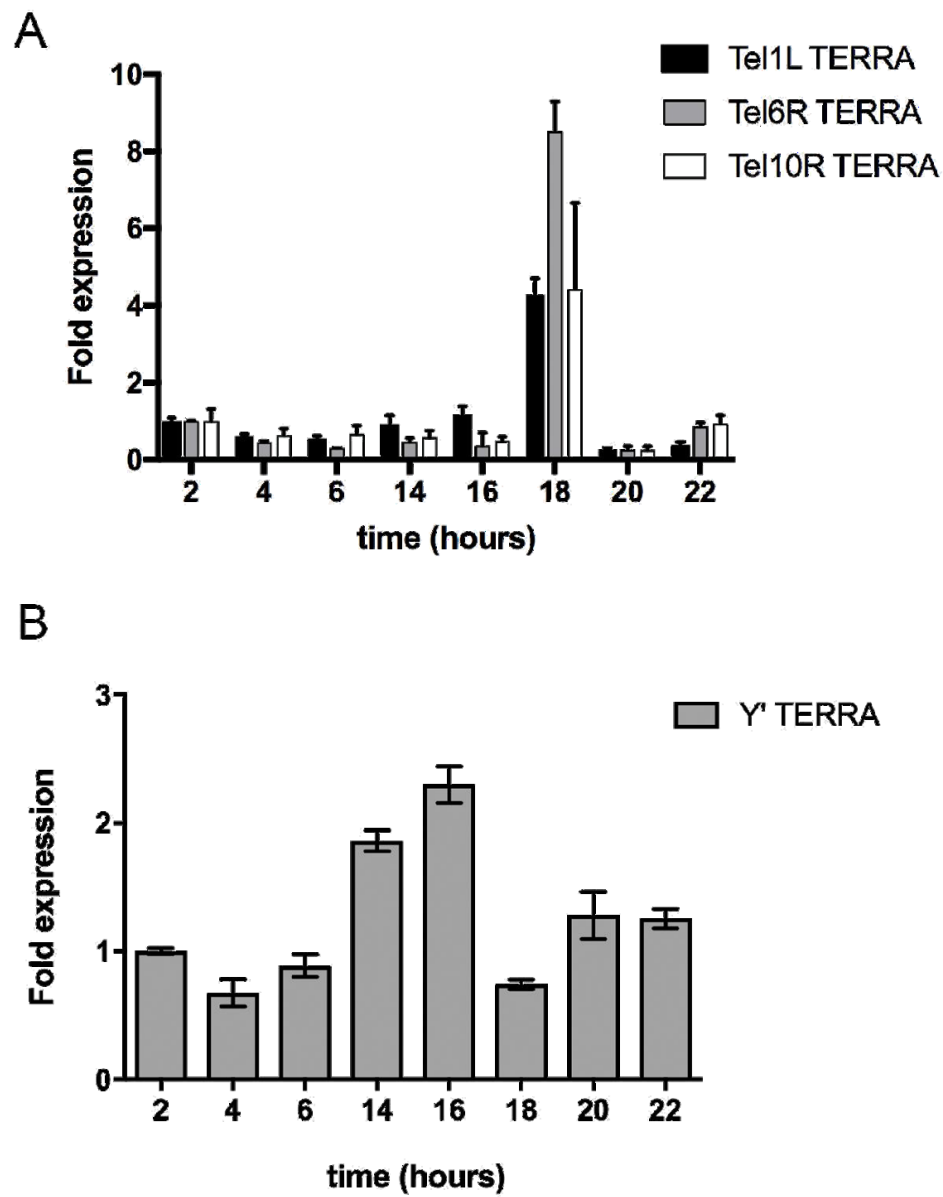


Figure 25. – TERRA expression is upregulated during diauxic shift.

RT-qPCR analysis shows that TERRA from telomeres 1L, 6R, 10R (A) and Y' (B) is induced during diauxic shift compared to cells in logarithmic phase. Expression of TERRA was normalized on *ALG9* and *TAF10* mRNAs. Data are representative of 3–5 independent experiments

Table 2. – Half-life of TERRA in log phase and diauxic shift (N ≥ 3)

RNA	Half-life (min)	
	Log phase	Diauxic shift
Tel1L TERRA	29 ± 6	26 ± 7
Tel6R TERRA	39 ± 8	37 ± 2
Y' TERRA	23 ± 3	31 ± 14
<i>ACT1</i>	18 ± 1	19 ± 4

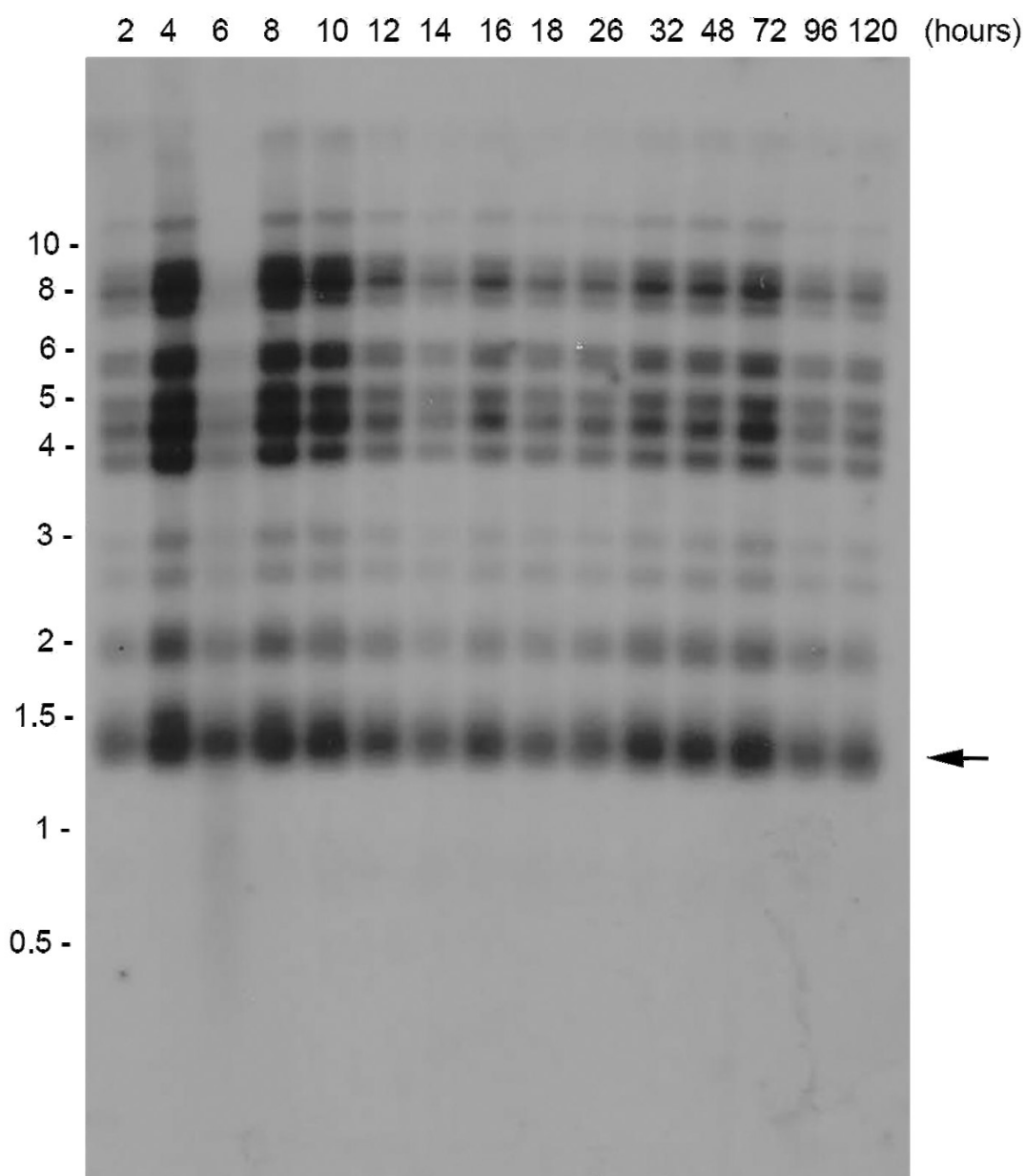


Figure 26. – Telomere length is maintained during diauxic shift.

Genomic DNA was extracted from each time point of the time course analyzed. DNA was digested using BglII restriction enzyme and telomere length was analyzed using a radioactive telomeric repeat sequence-specific probe. Arrow points at telomeric fragments

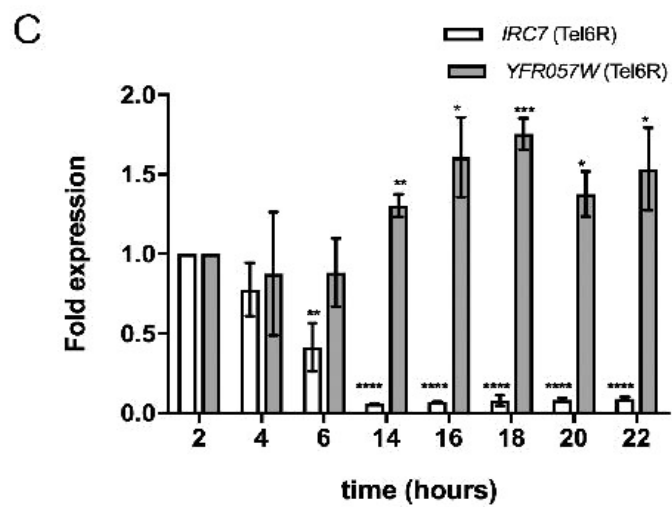
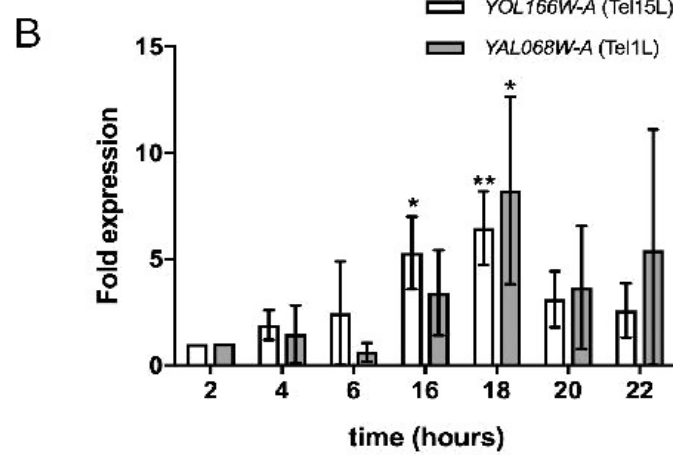
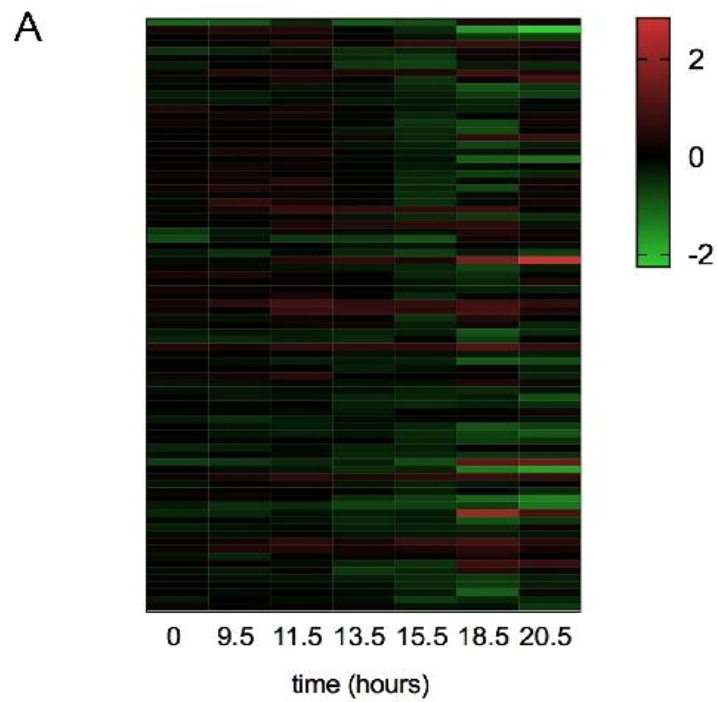


Figure 27. – Telomere position effect is maintained during diauxic shift.

A. Heat map showing the expression of 82 subtelomeric genes from log phase (0 h) to diauxic shift (18.5 h). Red and green indicate fold increase and decrease, respectively, in gene expression (expressed as log2). B. Expression of subtelomeric genes *YOL166W-A* (telomere 15L) and *YAL068W-A* (telomere 1L) located 1 Kb from the telomeric repeats. C. Expression of subtelomeric genes *YFR057W* and *IRC7*, 1 and 5 Kb from telomere 6R, respectively. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$; **** $p < 0.001$

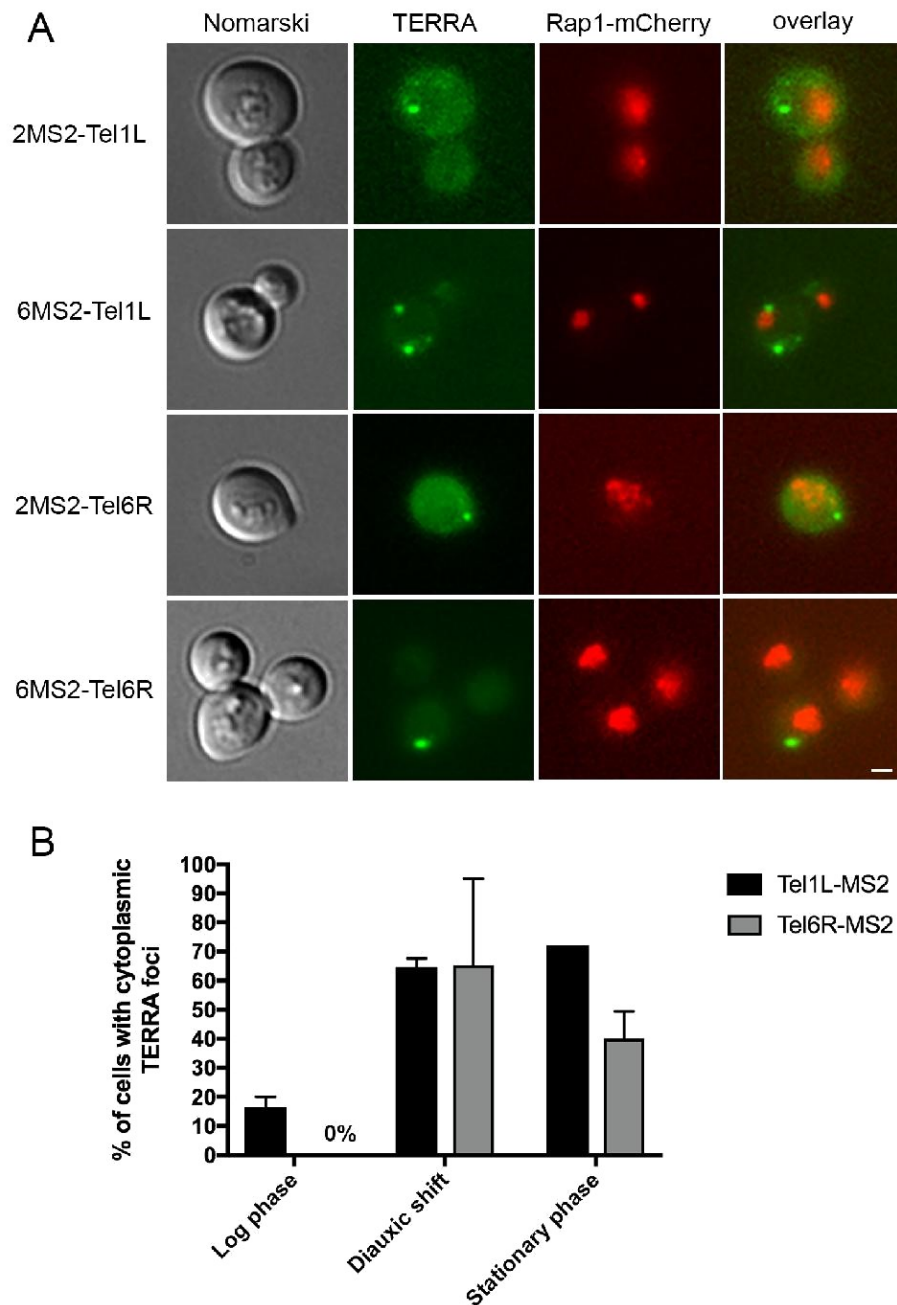


Figure 28. – Accumulation of TERRA in the cytoplasm of cells in diauxic shift.

A. Microscopy analysis of MS2-tagged Tel1L and Tel6R TERRA clones reveals an accumulation of TERRA foci in the cytoplasm during diauxic shift. Rap1-mCherry is used to label the nucleus. Scale bar 1 μm. B. Quantification of yeast cells expressing either Tel1L or Tel6R TERRA, with TERRA foci in their cytoplasm during log phase, diauxic shift or stationary phase. N ≥ 2

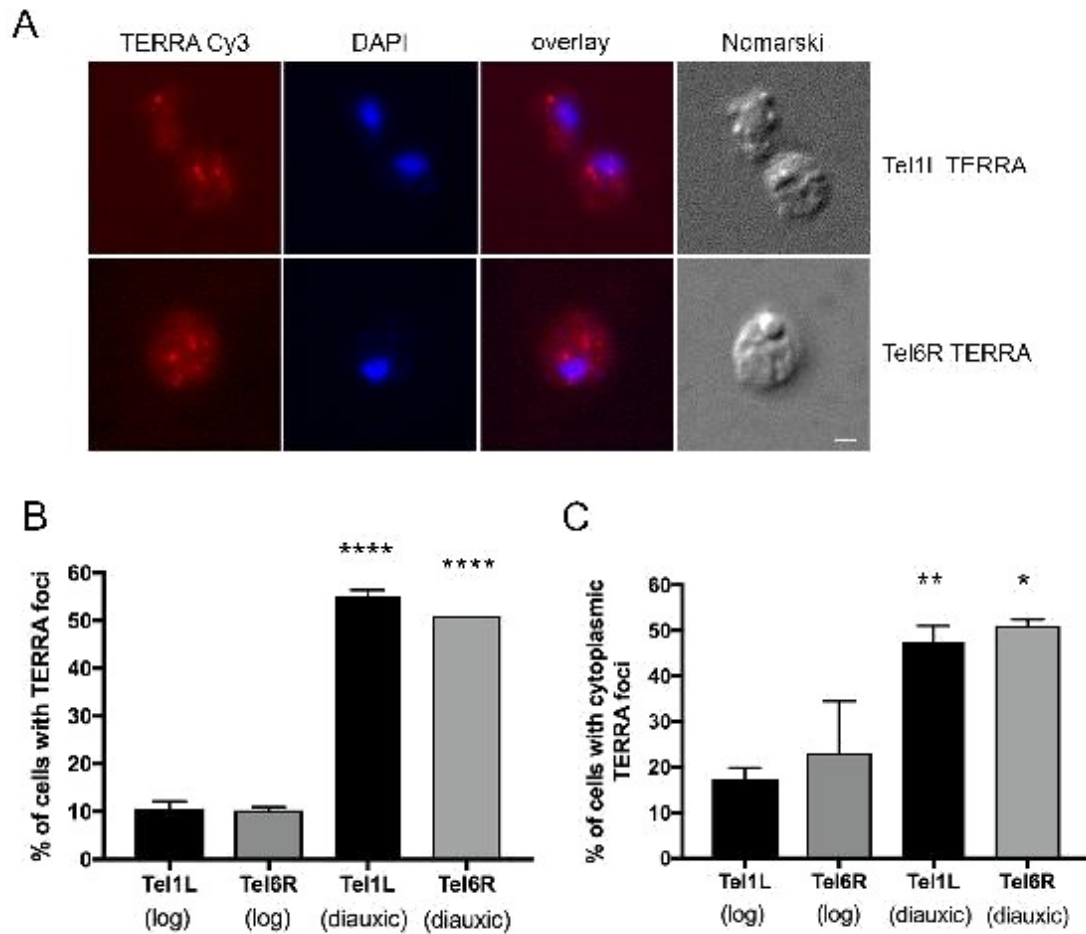


Figure 29. – FISH detects TERRA induction and accumulation in the cytoplasm during diauxic shift.

A Quantitative FISH analysis of endogenous Tel1L and Tel6R TERRA in yeast cells during diauxic shift. Scale bar 1 μ m. B. Quantitative FISH confirms the induction of Tel1L and Tel6R TERRA in the yeast cell population during diauxic shift. C. TERRA foci accumulate in the cytoplasm during diauxic shift compared to log phase. Log phase (OD_{600} 0.3–0.4) or diauxic shift (OD_{600} 4.9–6.9) yeasts were analyzed. Only cells expressing TERRA were quantified. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$

3.3.8. Supplementary materials

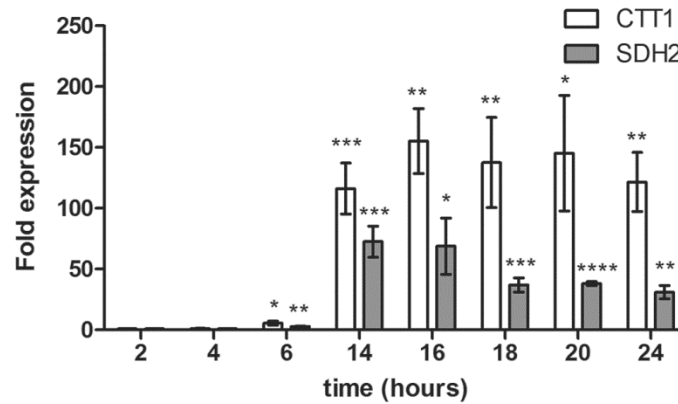


Figure S6. – Validation of diauxic shift induction using specific gene markers.

RT-qPCR analysis shows that *CTT1* and *SDH2* mRNAs are induced during diauxic shift compared to cells in logarithmic phase. Expression of these transcripts was normalized on *ALG9* and *TAF10* mRNAs. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$

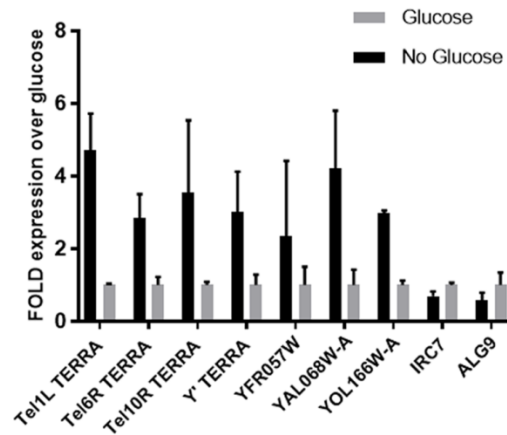


Figure S7. – Expression of TERRA and subtelomeric genes during glucose starvation.

Expression of TERRA from telomere 1L, telomere 6R, telomere 10R, Y' telomeres and subtelomeric genes *YOL166W-A* (telomere 15L), *YAL068W-A* (telomere 1L), *YFR057W* and *IRC7*. The *ALG9* gene is used as negative control.

4. Article 3 – Contrôle de l’expression de TERRA par la cohésion télomérique chez *Saccharomyces cerevisiae*

Telomeric cohesion controls TERRA expression in budding yeast

Auteurs : Maxime Lalonde¹, Hadrien Laprade¹, Emilio Cusanelli², Pascal Chartrand¹

1 Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Université de Montréal, Montréal, QC, H3C 3J7, Canada.

2 Centre for Integrative Biology (CIBIO), University of Trento, Trento, Italy.

En préparation

4.1. Mise en contexte

Ce manuscrit avait pour but d'étudier la localisation et l'organisation des télomères exprimant l'ARN non-codant télomérique TERRA (telomeric repeats containing RNA). La localisation à la membrane nucléaire et l'agrégation des télomères influence la répression de la transcription sous-télomérique. Dans ce contexte, nous avons étudié le comportement des télomères exprimant TERRA dans le but de vérifier si l'expression de TERRA était corrélée avec une localisation ou un comportement télomérique particulier. En utilisant des approches de microscopie en cellules vivantes, d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) et de RT-qPCR, nous avons étudié les liens entre l'expression de TERRA, la longueur des télomères et la cohésion télomérique. Nos données montrent que les télomères courts perdent leur cohésion durant la phase S. Cette perte de cohésion dépend de la protéine Sir4, mais est indépendante du rôle du complexe SIR dans l'établissement de l'hétérochromatine aux télomères. Le recrutement forcé de la cohésine à un télomère court diminue l'expression de TERRA et élimine la perte de la répression à ce télomère. Ces travaux renforcent l'hypothèse que les complexes de maintenance structurelle (SMC) sont des régulateurs importants de l'expression de TERRA par leur effet sur l'organisation structurelle générale des télomères.

4.2. Contribution des auteurs

Emilio Cusanelli est à l'origine du projet. Pascal Chartrand, Emilio Cusanelli et moi-même avons participé à la conception des expériences. J'ai effectué la rédaction du manuscrit. Emilio Cusanelli a effectué les expériences de microscopie impliquant TERRA et a participé aux expériences de ChIP. Hadrien Laprade et moi-même avons effectué le reste des expériences d'imagerie en cellules vivantes. Emilio Cusanelli et moi-même avons effectué les expériences de ChIP et j'ai procédé aux expériences de RT-qPCR.

4.3. Texte de l'article

4.3.1. Abstract

The heterochromatin state of telomeres represses the transcription of nearby regions. Nevertheless, telomeres are transcribed in a telomeric repeat-containing long non-coding RNA called TERRA. In *Saccharomyces cerevisiae*, TERRA expression is repressed by Sir-mediated transcriptional inhibition and Rat1-dependent degradation. However, at short telomeres, TERRA escape this inhibition and accumulate in a single focus that nucleates telomerase molecules in a cluster named T-Recs. T-Recs allow the concentration of telomerase activity and its targeting to short telomeres may promote their preferential elongation. TERRA expression is also altered by telomere length-independent mechanisms in response to different stresses by unknown mechanisms. Herein, we report that TERRA expression correlates with premature loss of telomere cohesion in S phase in budding yeast. This loss of cohesion is induced by telomere shortening in a Sir4-dependent, but Sir2-independent manner. Furthermore, we show that cohesin regulates TERRA expression at several telomeres and forced recruitment of cohesin at a short telomere inhibits TERRA expression. Our findings suggest a role for cohesin and telomere cohesion in the regulation of TERRA transcription in budding yeast.

4.3.2. Introduction

Telomeres are the structure at the end of linear chromosomes which preserves genomic integrity by preventing their detection as double strand breaks (DSB), as their erroneous repair could trigger chromosomes end-to-end fusions (463). In *Saccharomyces cerevisiae*, telomeres are composed of 300 bp of TG₍₁₋₃₎ with a 15 nt 3' overhang (1, 2). Double stranded telomere sequences are bound by the Rap1 protein, which in turn recruits the proteins Rif1 and Rif2. Their binding promotes end protection, inhibits DNA damage response and inhibits telomere elongation (1, 2). Rap1 also interacts with the SIR complex which is responsible for the

establishment of heterochromatin at telomeres, as phenomenon known as telomere position effect (TPE) by which telomere proximal transcription is inhibited (1, 2). Due to the end-replication problem, chromosomes ends cannot get fully replicated and telomeres shorten with each cell division (482). To bypass telomere shortening, highly dividing cells and most unicellular organisms express telomerase, a ribonucleoprotein complex with a reverse transcriptase activity that add telomeric repeats to replenish telomeres (77, 483). In *S. cerevisiae*, a *cis* protein-counting mechanism, by which the length of telomeres dictates the number of telomere-bound telomerase negative regulators, allows a preferential recruitment of telomerase to short telomeres (19, 20, 24, 26, 77, 137, 139).

Still, telomeres are transcribed in a long non-coding RNA called TERRA. The expression of TERRA and of telomere proximal genes is negatively regulated *in cis* by the SIR complex, via a telomere length dependent mechanism (162, 166). Rap1, Rif1 and Rif2 also contribute to the inhibition of TERRA by their interaction and activation of the Rat1 5'-3' exonuclease, which degrades TERRA (159, 162, 166). These telomere length-dependent mechanisms regulating TERRA expression license short telomeres to express more TERRA. Indeed, a small number of telomeres can escape repression and express TERRA, which accumulate into nuclear foci and nucleate telomerase recruitment clusters (T-Recs) (168). These clusters represent a higher-order structure of telomerase that allow the concentration of telomerase activity targeted for the extensive elongation of short telomeres (168, 176).

Structural maintenance complexes (SMC) have been recently shown to regulate transcription at telomeres in yeast. One of the SMC complex is the ring-shaped cohesin complex, which is composed of three main proteins, namely Smc1, Smc3 and Mcd1/Scc1/Rad21, and of three associated proteins regulating cohesin functions: Scc3, Pds5 and Wpl1 (304, 484). Its principal role is to establish sister chromatid cohesion after DNA replication until anaphase. Cohesin loading on chromosomes is promoted by the loading complex Scc2-Scc4 and is not regulated by a sequence motif (304, 484). Cohesin-associated regions (CARs) are often AT-rich domains found at intergenic regions or in convergent transcription regions (319, 322). Cohesin can be loaded on chromosomes in G1 but it is actively removed by the interaction of the Wpl1-Pds5 complex with the Smc3-Mcd1 interface, which

destabilizes the ring complex favoring cohesin release from chromatin (304, 340, 485). When the cell commits to replication, the Smc3 head domain is acetylated by Eco1, antagonising the interaction with Wpl1-Pds5 and locking the cohesin ring on the chromatin (304, 354). This allows the entrapment of sister chromatids by the cohesin ring during S phase. Cohesion is maintained up to anaphase, when the APC/C complex triggers the release of the separase enzyme, which cleaves the cohesin subunit Mcd1 (304, 484). This allows the release of sister chromatids from cohesin rings and proper sister chromatids segregation between the mother and the daughter cells.

Recent evidence suggests that alteration of the structural organisation of telomeres impacts telomeric transcription. Indeed, growing the temperature sensitive allele *mcd1-1*, a subunit of the cohesin complex, at semi-permissive temperature disrupts subtelomeric genes expression in a TPE-independent manner (486). Our laboratory recently showed that another SMC complex, called SMC5/6, plays a role in the structural organisation of telomeres and its disruption induces defects in telomere localisation, clustering, TPE and TERRA repression (473). Furthermore, disruption of telomere clustering and localisation at the nuclear membrane affects TPE (70, 147-149). Herein, we show that short telomeres display premature loss of cohesion in S phase, which correlates with TERRA expression. This loss of cohesion is dependent on Sir4, but not on TPE. Finally, we found that the presence of cohesin, and cohesion, at telomeres plays an important role in the repression of telomeric transcript TERRA.

4.3.3. Results

4.3.3.1. TERRA-expressing telomeres display premature loss of cohesion in S phase

To study the dynamics of TERRA-expressing telomeres in living cells, we coupled the MS2 system to image TERRA expression from a single telomere with simultaneous imaging of its

telomere labeled with the TetO-TetR system (168, 180). Briefly, six MS2 stem-loops were integrated 80 nucleotides upstream of the telomeric repeats of telomere 6R (tel6R) in a manner that when TERRA is transcribed from that telomere, the resulting RNA molecules possess MS2 stem-loops (Figure 30A). The coexpression of the MS2 coat-protein fused to GFP (MCP-GFP) allowed the labelling of Tel6R-TERRA with GFP. To simultaneously image the telomere 6R, an array of 112 TetO repeats was introduced in the subtelomere 6R and the coexpression of a TetR-mCherry fusion protein allowed its detection by live-cell imaging (Figure 30A). The specific integration at telomere 6R of the TetO array was verified by Southern blot (Figure S8). Following imaging of both GFP-labeled Tel6R-TERRA RNA and mCherry-labeled telomere 6R, we noticed that a significant number of TERRA expressing cells displayed a telomere 6R doublet in S phase, as established by the bud-to-mother ratio (Figure 30B). This observation was surprising since these doublets are typical of sister chromatid separation during anaphase but, in this case, telomere doublets were seen much earlier in the cell cycle.

To investigate if this premature loss of cohesion was specific to TERRA-expressing telomeres, we determined if telomere 6R loss of cohesion was observed when TERRA was expressed from another telomere, like telomere 1L. In this case, MS2 stem-loops were integrated upstream of the telomere 1L, while TetO repeats were in the subtelomere 6R. We observed that in over 60% of S-phase cells expressing Tel6R-TERRA, telomere 6R doublets were visible. Conversely, when Tel1L-TERRA was expressed, less than 10% of S phase cells displayed a loss of cohesion at telomere 6R (Figure 30C). These results suggest that the loss of telomere cohesion in early S-phase correlates with TERRA expression from this telomere.

4.3.3.2. Telomere shortening induces loss of telomeric cohesion

Short telomeres are known to behave differently than normal length telomeres. They replicate earlier and display reduced TPE and enhanced TERRA transcription (23, 31, 168, 487). For this reason, we investigated if telomere shortening could recapitulate our observations on TERRA-expressing telomeres. To do so, we used a system based on the galactose-inducible

shortening of a single telomere developed by the Marcand lab (488) (Figure 31A). Briefly, a cassette composed of 270nt of telomeric repeats and a *URA3* selection gene, both flanked by FRT (FLP1 recognition target) sites, was integrated at the telomere 6R. Expression of the FLP1 recombinase under the control of a galactose inducible promoter triggers removal of the telomeric repeats and the *URA3* gene, leading to the formation of a single short telomere. A control strain was generated with only the *URA3* gene flanked by the FRT sites integrated at the telomere 6R. In this control, only the *URA3* gene is removed by the recombinase, leaving the telomere tracts intact (Figure 31A). Tel6R doublets formation was then assessed by using the TetO-tetR system described above. The functionality of the galactose inducible tel6R shortening was verified by Southern blot and by qPCR assay (Figure S8E-F, Figure S10).

By using these systems, we noticed an increase in premature loss of cohesion at short telomeres in early S-phase cells (Figure 31B). Quantification of telomere 6R doublets showed that 43% of cells with shortened telomere 6R displayed impaired sister chromatid cohesion, while only 2% of cells with telomere 6R at normal length displayed abnormal cohesion in S phase (Figure 31C). Furthermore, time-lapse imaging of telomere cohesion dynamics in S phase showed that telomere 6R doublets are transient (Figure S9). Indeed, a telomere 6R focus could split in a doublet and reform a single focus a few times during a single S phase.

Genome-wide chromatin immunoprecipitation (ChIP) analyses of cohesin subunits in yeast have revealed the presence of cohesin binding near telomeres of several chromosomes (319). To determine if the loss of cohesion was due to a reduction of cohesin binding near telomeres, we investigated if telomere shortening induces a decrease in cohesin enrichment by ChIP. To do so, we immunoprecipitated the cohesin complex via its subunit Mcd1 fused to a 13XMYC tag. To be able to detect discrete cohesin enrichment sites at telomere 6R, we used multiple primer pairs along the telomere 6R subtelomeric region, within 6kb before the telomeric tracts (Figure 31D). As controls to assess that possible changes at the telomere were only due to telomere shortening, we designed primers for amplicons at 70, 90 and 100kb from the telomere on the right arm of the chromosome 6. These sites are far enough from the telomere 6R that they should not be affected by telomere 6R shortening. The 70kb and 100 kb loci upstream of telomere 6R were used as positive controls, as they showed enrichment of

Mcd1 in a previous study (319). The 90kb locus upstream of telomere 6R was used as a negative control, as it showed low Mcd1 binding in the same study. After immunoprecipitation (IP), enrichment of Mcd1 was normalized on the 100kb locus to remove artefacts due to difference in overall IP efficiency between experiments. Specificity of the immunoprecipitation was assessed by performing a mock IP (Figure S10A-B). As expected, we detected an enrichment of Mcd1 at the 70kb locus but not at the 90kb locus, validating our ChIP assay (Figure 31E). Overall, the subtelomeric region of telomere 6R showed a low enrichment for Mcd1, with the exception of a single binding site at 1kb from the telomeric repeats (Figure 31E). Surprisingly, shortening of telomere 6R did not induced any noticeable change in Mcd1 binding and enrichment at telomere 6R (Figure 31E). These results suggest that the loss of cohesion observed at a short telomere 6R may not be due to a reduction in cohesin binding near this telomere, but may be caused by a step downstream in the establishment of cohesion.

4.3.3.3. Sir4 plays a role in the length-dependent regulation of telomere cohesion.

As telomere cohesion is impaired at short telomeres, we investigated if the deletion of telomeric proteins known to regulate telomere length could affect telomeric cohesion. We used the inducible tel6R shortening system and the TetO-TetR-mCherry imaging to quantify loss of cohesion at a short telomere in various mutants, such as *SIR2Δ*, *SIR4Δ*, *RIF1Δ*, *RIF2Δ* or *PIF1Δ*. Interestingly, none of these deletions increased the number of cells showing a telomere 6R doublet, either in strains with normal or short telomere 6R (Figure 32). This suggests that cohesion at telomeres might not be regulated by a telomere-specific mechanism. In opposition, deletions known to increase telomere length, such as *RIF1Δ*, *RIF2Δ* and *PIF1Δ*, decreased the number of cells with short telomere 6R displaying a telomere doublet (Figure 32). In these mutants, telomere length is increased by 100 to 600bp (24, 382), so a short telomere in these backgrounds will end up with a normal length or a long telomere. This suggests that the cohesion defect at telomeres is typical of short telomeres and is regulated by telomere length.

We also looked if heterochromatin at telomeres may affect the premature loss of cohesion at short telomeres. We repeated the quantification of telomere 6R doublets in *SIR2Δ* and *SIR4Δ* mutants. Importantly, *SIR2Δ* and *SIR4Δ* cells show only a minimal telomere shortening of less than 50 bp (489). Surprisingly, tel6R shortening in a *SIR4Δ* background nearly completely suppressed telomere doublet formation (Figure 32). On the other hand, deletion of *SIR2* did not induce a significant reduction of tel6R doublets compared to the *SIR2* wild-type strain (Figure 32). This result shows that Sir4 is important to control cohesion at short telomeres. This role of Sir4 at short telomeres is counterintuitive as short telomeres have less Sir4 binding sites. Also, the absence of a similar effect in a *SIR2Δ* background suggests that the role of Sir4 is independent from the deacetylation function of the SIR complex.

4.3.3.4. Cohesin acts in cis to inhibit TERRA expression and increase TPE

To study the potential role of the impaired cohesion observed at short telomeres, we turned again to TERRA expression, as we showed above that loss of telomere cohesion is linked to increased TERRA expression. Furthermore, cohesin regulates TERRA expression in human cells (457, 490). To study the impact of telomere cohesion on telomeric transcription, we used the temperature sensitive mutant *mcd1-1*. At a restrictive temperature of 37°C, *mcd1-1* cells are not viable because of cohesion defects (361). However, at the semi-permissive temperature of 31°C, *mcd1-1* cells are viable, showing only a slight growth defect, suggesting that global genomic cohesion is maintained at this temperature (486). A recent study has shown that growing the *mcd1-1* mutant at semi-permissive temperature induced a telomere silencing defect, increasing the expression of subtelomeric genes (486). This temperature also promotes a 20% increase in the loss of telomere cohesion (486). We therefore applied this assay to determine if cohesin plays a role in regulating TERRA expression at telomeres. By growing *mcd1-1* cells at 31°C, we confirmed the derepression of several subtelomeric genes by quantitative RT-PCR (Figure 33A). Furthermore, we were able to assess that the silencing defect observed in the

mcd1-1 mutant also applied to TERRA expressed from nearly all the telomeres tested (Figure 33A), suggesting that cohesin also regulates TERRA expression.

To validate the role of cohesin on telomeric transcription, we modified the TetO-TetR system to force the recruitment of cohesin on a short telomere. Using a fusion of TetR to the cohesin subunit Mcd1 or the loading complex protein Scc4, the cohesin complex could be recruited to the telomere 6R with a tetO array. Combined with the inducible telomere shortening system, the effect of forced cohesion on the transcription at a short tel6R could be tested (Figure 33B). In cells expressing TetR-mCherry, Tel6R-TERRA expression was increased by more than 20X when tel6R was shortened, without affecting TERRA expressed from other telomeres (Figure 33C). Furthermore, the expression of *YFR057W*, the closest ORF to the telomere 6R which is heavily regulated by TPE, was also increased by more than 40X without affecting the expression of *IRC7*, an ORF located more than 5kb upstream of tel6R, showing a decrease of TPE when telomere 6R is shortened (Figure 33D). Interestingly, forced recruitment of Mcd1 or of the cohesin loading complex Scc2-Scc4 at a short telomere 6R completely suppressed the effect of telomere shortening on both TERRA expression and on the subtelomeric gene *YFR057W* (Figure 33C-D). Altogether, these results support a role for telomere cohesion in the repression of telomeric transcription *in cis*. Furthermore, this suggests that loss of cohesion at short telomeres is another regulatory mechanism licensing higher TERRA expression.

4.3.4. Discussion

In this study, we used live-cell imaging of a single short telomere to study the impact of telomere shortening on the telomere structural organisation and transcription. By doing so, we observed a premature loss of cohesion at short telomeres in early S phase. In addition, time-lapse acquisition showed that tel6R doublets are transients, suggesting that sister chromatids go through cycles of association-dissociation or that the reformation of a single focus is obtained by the probabilistic colocalisation of both chromatids. Nonetheless, the transient nature of

telomere 6R doublets suggests that the number of telomere 6R showing an impaired sister chromatid cohesion might be underestimated.

Surprisingly, this loss of cohesion is not caused by a decreased binding of cohesin at the telomere, as demonstrated by the unaltered ChIP enrichment of Mcd1-13MYC at a short telomere 6R. This might suggest that the observed loss of cohesion is induced at a step downstream of cohesin loading in the cohesion establishment pathway. Impairment of Smc3 acetylation by Eco1 or enhanced interaction with Wpl1-Pds5 could lead to such a phenotype. As such, they are good candidates for further investigation.

Furthermore, our results show that telomere length regulation of cohesion is dependent on Sir4 but does not depend on Sir2. This is surprising and points towards a unique role for Sir4 in this process, independent from its role in the SIR complex and in telomeric heterochromatin formation. One role specific for Sir4 is the localisation of telomeres to the nuclear membrane. The presence of different semi-redundant pathways to tether telomeres at the nuclear membrane suggests that different complexes might exist at the membrane. These complexes may establish different membrane sub-compartments and regulate differentially telomere biology, reminiscent of how the differential localisation of DSBs at the nuclear membrane can favor different DNA repair pathways (232, 291). We hypothesize that the Sir4-dependant telomere membrane anchoring pathway could play a role in differentially regulate short telomere cohesion. Indeed, 60% of telomeres in WT cells shows a membrane localisation while, in a *SIR4Δ* background, there is 10-20% less telomeres at the membrane (154). These telomeres that cannot localize at the membrane in cells lacking Sir4 might represent short telomeres. Investigating the role of Sir4-mediated membrane anchoring in the loss of cohesion at short telomeres could provide new insights in the roles of the nuclear membrane periphery in telomere biology.

In addition, we showed that telomere cohesion negatively regulates TERRA expression and TPE *in cis*. Given the role of TERRA in promoting telomerase cluster (T-Recs) formation, the loss of cohesion at short telomeres may be necessary to allow TERRA expression. Like us, others have reported a role for Mcd1 in repressing subtelomeric genes in a SIR-independent manner

(486). While the mechanism by which the cohesin complex may impact telomeric transcription remains unclear, a minor but still significant increase of the H4K16ac histone mark in *mcd1-1* cells grown at a semi-permissive temperature was observed, opening the possibility that cohesin might regulate the formation of subtelomeric heterochromatin (486). In human cells, the association of cohesin and CTCF establishes a physical barrier to the propagation of heterochromatin, limiting the activity of histone modifying enzymes (327, 363). In *S. cerevisiae*, no such physical barrier has been discovered at telomeres. Indeed, the limit of the propagation of telomeric heterochromatin is thought to be established by the competition between the histone deacetylation activity of the SIR complex and the histone acetylation activity of Sas2 (39). Nonetheless, even if the changes in histone acetylation state in a *mcd1-1* mutant are minor, this could reveal a potential function for telomere cohesion in inhibiting subtelomeric histone acetylation and, by doing so, limiting the spreading of euchromatin in subtelomeres. This role for the cohesin complex would be similar to its insulator element function at the HMR locus (366).

In conclusion, this study establishes a novel pathway by which short telomeres can regulate TERRA expression and TPE. We propose that the Sir4-mediated differential membrane localisation of short telomere perturbs cohesion establishment and that, in turn, alleviates TERRA repression (Figure 34). The mechanisms by which cohesion affect transcription are still unclear but global structural organisation have been shown to affect telomere transcription. As cohesin is already an established TERRA expression regulator in human cells, it is possible that the mechanisms by which telomere length impact telomere cohesion is also conserved.

4.3.5. Experimental procedures

4.3.5.1. Yeast strains

All the strains used in this study were generated in a W303 background, with the exception of the strains used to quantify TERRA expression by microscopy, which are derived from FY23 and are taken from (168) (see Table S4). Yeast knockout strains were generated by disrupting the *SIR2*, *SIR4*, *RIF1*, *RIF2* or *PIF1* genes by a one-step PCR disruption method using the HYGRO selection marker. The Mcd1-13MYC strains were generated by the introduction of 13MYC tag at the *MCD1* chromosomal locus and were generated by a PCR one-step tagging method using a pFA6A-13Myc-KANMX4 plasmid (447). Verification of these strains was performed by PCR and Western blot. The 112TetO-tel6R strains were generated by the introduction at telomere 6R of a 112TetO::Kan cassette extracted by digestion from a pRS306 112-TetO-tel6R::KAN plasmid. Validation of the strains was performed by Southern blot and microscopy (Figure S8). The tel6R shortening strains were generated by integration at the end of telomere 6R of the 225 (CTR) or the 229 (SHORT) cassettes extracted by digestion from the corresponding plasmids. The galactose inducible Flp1 recombinase was added by integration of the pFV17 plasmid. Verification of the integrations was performed by PCR and Southern blot. The inducible shortening was verified by Southern blot and gDNA-qPCR (Figure S8, Figure S10C).

4.3.5.2. Live-cell imaging

Yeast cells were grown overnight at 30°C and then diluted to an OD₆₀₀ of 0.1 and grown until an OD₆₀₀ of 0.3–0.4. For TERRA-MS2-GFP foci imaging and telomere 6R doublets imaging experiments, cells were imaged with a Zeiss Axio-Observer Z1 Yokogawa CSU-X1 spinning disk inverted confocal microscope, using a 100×/1.46 NA objective, an EMCCD Evolve camera (Photometrics, 512×512 pixels, 16 µm), a 488nm 100mW diode and a 561nm 40mW diode. 0,29

µm steps Z-stacks were acquired spanning the whole nucleus. At least 50 cells were scored for each experiment.

4.3.5.3. Telomere shortening experiment

Cells were grown overnight at 30°C in YP+raffinose. In the morning, yeast cultures were diluted to an OD₆₀₀ of 0.1-0.2 in YP+galactose and grown for 3 hours to allow expression of Flp1 recombinase. Then, glucose was added to the culture and let to grow for 2 additional hours to stop the expression of Flp1 and recover from galactose. Telomere shortening was confirmed using qPCR (Figure S10C).

4.3.5.4. Chromatin Immunoprecipitation

Cells were grown as explained in the “telomere shortening experiment” experimental procedure. Then, 50mL aliquots were fixed in 1% formaldehyde for 15 minutes. PFA was quenched by adding 3 mL glycine 2,5M pH8 for 5min. Cells were collected and washed twice in ice-cold PBS. Pellets were resuspended in 400 µl lysis buffer (50 mM HEPES pH 8, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% sodium deoxycholate, 1% Triton X-100) containing protease inhibitors (EDTA-free protease inhibitor mix and 1 mM PMSF, Roche) and RNase inhibitor (2 mM vanadyl ribonucleoside complex [VRC]). Cells were lysed using glass beads by vortexing 10 times × 1min. Lysates were eluted in new tubes by needle puncturing and centrifuged 3 min at 2,000 rpm and 4°C, and supernatants were transferred into new tubes. Samples were sonicated using a Fisher Scientific model 120 sonic dismembrator to obtain 500bp chromatin fragments.

Samples were then precleared for 1 hr at 4°C with 45 µl of equilibrated Dynabeads protein G (Invitrogen). After a preclearing step, 2% was kept for the input sample, 48% was kept to check sonication, and the rest was split in 2 to perform the immunoprecipitation overnight at 4°C. To one half of the remaining sample, a monoclonal 9E10 anti-MYC antibody (Roche) was

added and to the other half no antibody was added (Figure S10A). The following day, 45 μ l of Dynabeads were added to each sample, and binding to the antibodies was allowed for 1 hr at 4°C. Protein bead complexes were collected and washed 6 times for 5 min each at 4°C. The first two washes with 1 mL of lysis buffer; the two subsequent washes with 1 mL of lysis buffer containing 500 mM NaCl; the fifth wash with 500 μ l of LiCl wash buffer (10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA pH 8, 0.25 M LiCl, 0.5% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate); and the last wash with 500 μ l of NaCl wash buffer (10 mM Tris pH 8, 1mM EDTA pH 8, 100 mM NaCl). Protein bead complexes were eluted in 200 μ l elution buffer (10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA pH 8, 1% SDS) at 65°C for 2h. Then supernatant was transferred to a new tube and decrosslink was performed at 65°C overnight with 25 μ g of proteinase K. The next day, RNase A was added and samples were incubated at 37°C for 2h. DNA purification was performed by phenol/chloroform and chloroform extractions followed by DNA precipitation overnight at -20°C. DNA was resuspended in 40 μ l of H₂O and repurified using a PCR purification column kit and eluted in 400 μ L. qPCR experiments were performed in triplicates using 2 μ l of sample per reaction. Enrichments were calculated by the % of input method.

4.3.5.5. RNA Extraction and RT-qPCR Analyses

For the forced cohesion experiments, cells were grown as explained in the “telomere shortening experiment” experimental procedure. For the *mcd1-1* experiment, cells were grown overnight at 23°C and then diluted to an OD₆₀₀ of 0.1. They were then grown at 31°C until an OD₆₀₀ of 0.3–0.4. Cells were then washed 2X in ice-cold PBS, and resuspended in 400 μ l of ice-cold Tris/EDTA/SDS (TES) solution (10 mM Tris [pH 7.5], 10 mM EDTA, 0.5% SDS). 400 μ l of acid phenol were added and samples were incubated for 1 hr at 65°C with vortexing for 5 sec every 10 min. Samples were then centrifuged at 13,000 rpm for 10 min at 4°C. Supernatant then were purified by phenol/chloroform and chloroform extractions followed by RNA precipitation by the addition of 1/10 volume of 3 M NaAc (pH 5.2) and 2 volumes of 100% ethanol (ETOH). RNA was subsequently washed with 500 μ l of 70% ETOH and resuspended in diethylpyrocarbonate-

treated (DEPC) water. Nanodrop was used to assess purity and to quantify RNA. 1 µg was run on agarose gel for quality control. A total of 10 µg of RNA was treated with DNase I (Fermentas) for 4 hr at 37°C, and purified on a RNA purification kit (E.Z.N.A.). 1 µg of DNase-treated RNA was reverse transcribed by using a Superscript IV reverse transcriptase enzyme (ThermoFisher) and a mix of 0,5 µmol of a C-rich primer (CACCACACCCACACACCACACCCACA) and 0,5 µg of a polyd(t) primer. 20µg of cDNA was used for the qPCR experiments. qPCR experiments were performed using the qPCR master mix SsoFAST EvaGreen Supermix from Bio-Rad. qPCR was carried out on a Roche LightCycler96. TERRA expression was normalized against the *TAF10* mRNA expression.

4.3.6. Figures and tables

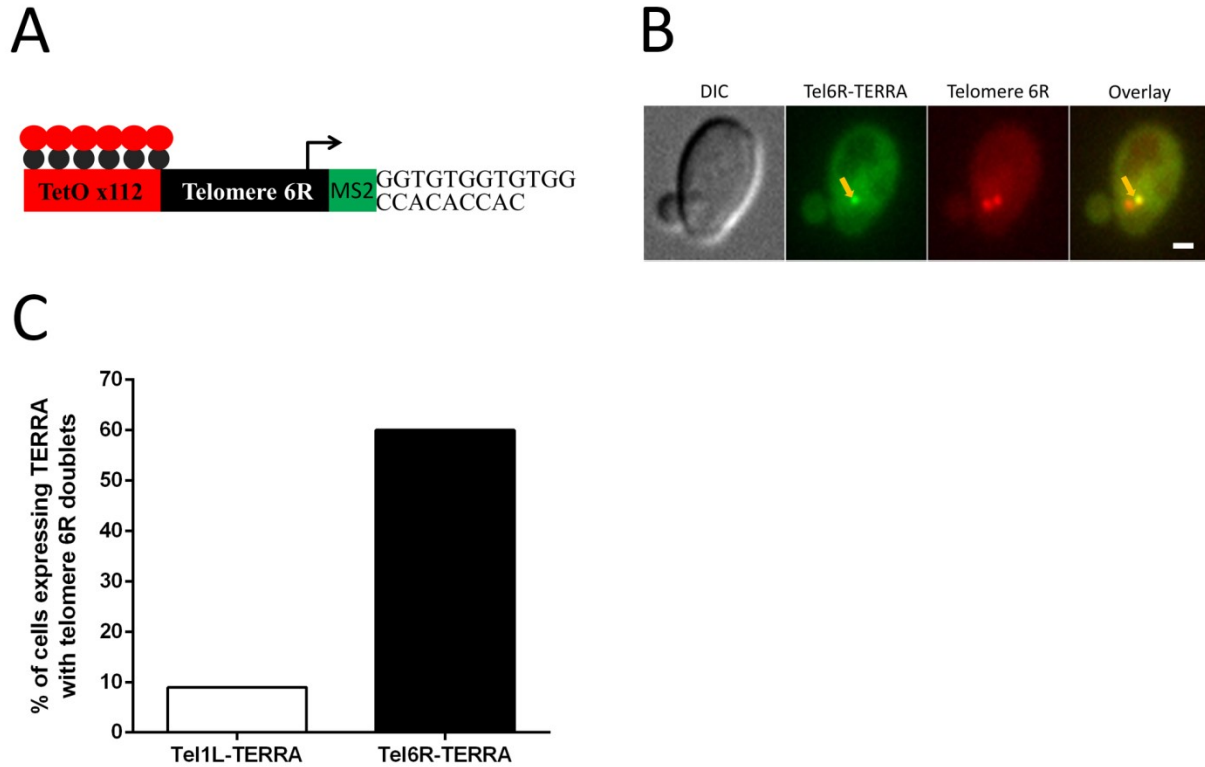


Figure 30. – TERRA-expressing telomeres display impaired cohesion.

(A) Representation of telomere 6R insertions to image simultaneously Tel6R-TERRA and telomere 6R itself. MS2 stem-loops sequences were introduced to allow visualisation of MCP-GFP/MS2-Tel6R-TERRA. An array of TetO repeats was integrated in the subtelomere to allow visualisation of TetR-RFP/TetO-tel6R. **(B)** Live-cell image of a telR-TERRA expressing telomere displaying an early S-phase loss of cohesion. Arrow points to TERRA focus. Scale bar = 1 μm. **(C)** Quantification of the number of S-phase cells expressing TERRA from specific telomeres that show a tel6R doublet. 11 cells expressing Tel1L-TERRA and 20 cells expressing Tel6R-TERRA were followed during a 30 minutes time course with 2 minutes time points.

cells showing normal telomere 6R cohesion (top) or loss of cohesion at telomere 6R (bottom). Telomere 6R was detected using the TetO-TetR-mCherry system. Scale bar = 1 μ m. (C) Quantification of the number of S phase cells that have a telomere 6R doublets in relation to telomere 6R length. Data shown represent mean \pm SD (N=3). *** p < 0.001, using unpaired t test (D) Representation of the telomere 6R subtelomeric region. Grey arrows represent ORF and blue lines represent amplicons used in the ChIP assay (from left to right: 5,6kb-tel6R; 4,6kb-tel6R; 4,2kb-tel6R; 3,6kb-tel6R; 2,2kb-tel6R; 1kb-tel6R; 0,2kb-tel6R). (E) Enrichment of Mcd1-13MYC at tel6R region. Mcd1 enrichment is shown as % of input and is normalized on the enrichment at 100kb-tel6R. The 70kb and 100kb loci were used as positive controls and 90kb locus as a negative control. The amplicons used are represented in panel D. Data shown represent mean \pm SD (N=7).

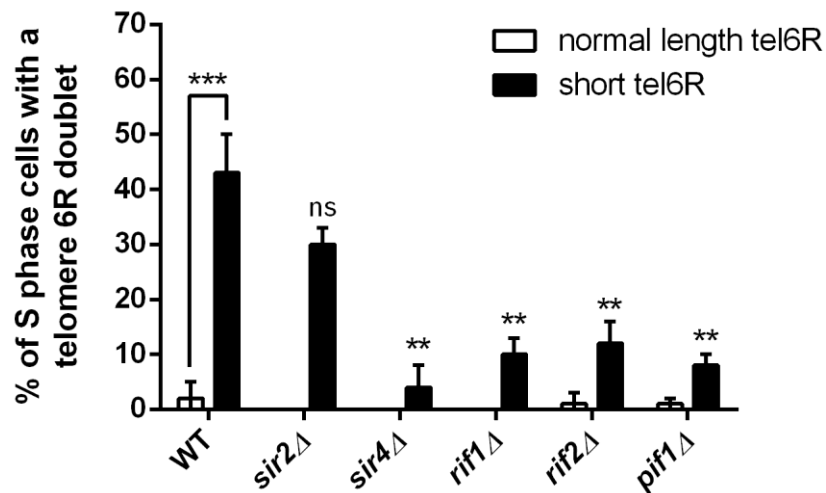


Figure 32. – Telomere loss of cohesion is dependent on telomere length and on Sir4.

Quantification of the number of S phase cells that have a telomere 6R doublet in different knockout strains. Data shown represent mean \pm SD (N=3). ** p < 0.01, ***p < 0.001 using unpaired t test.

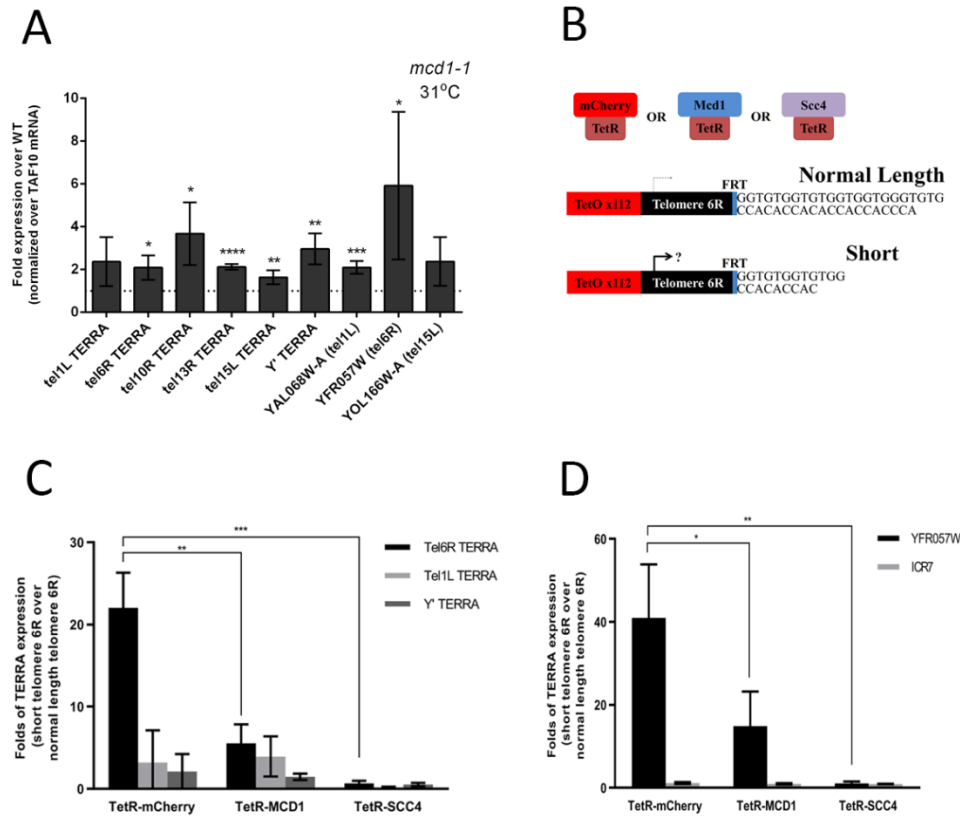


Figure 33. – Cohesin regulates TERRA expression and telomere proximal transcription.

(A) Quantification of the expression of TERRA and subtelomeric genes from various telomeres in a *mcd1-1* background at semi-permissive temperature (31°C). Expression was normalized with expression from *MCD1* WT background at the same temperature. Dotted line represents an expression value of 1. Data shown represent mean \pm SD (N=4). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, using unpaired t test. **(B)** Representation of the forced cohesion system used to study the effect of forced cohesion on the expression of TERRA at a single short telomere. **(C and D)** Quantification of the expression of Tel6R-TERRA and telomere 6R subtelomeric genes when cohesin was forced at telomere 6R. Forced cohesin binding was obtained by using either TetR-Mcd1 or TetR-Scc4. The expression of tel1L-TERRA and Y'-TERRA was used as controls for the induced Tel6R-TERRA expression by telomere 6R shortening. TetR-mCherry was used as a negative control. Expression was normalized using a normal length telomere 6R and using *TAF10* mRNA as a reference RNA. Data shown represent mean \pm SD (N=3). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, using unpaired t test.

Table S4. – Yeast strains used in this study

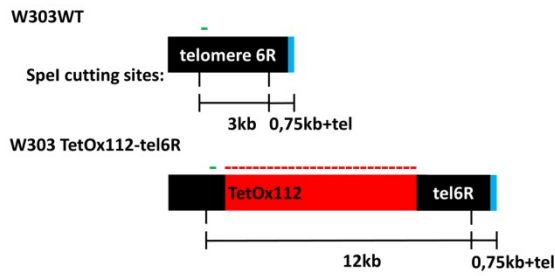
Strains	Genotype	Source
FY23	Mat A ura 3-52 trp1-Δ63 leu2-Δ1	
FY23 2MS2-Tel1L 112xTetO-Tel6R TetR-RFP / MS2-GFP	Mat A ura 3-52 trp1-Δ63 leu2-Δ1 2MS2::telomere1L 112xTetO-KAN::telomere6R TetR-RFP-NAT::chrVII YCPlac22 MS2-GFP	Cusanelli et al. (2013)
FY23 2MS2-Tel6R 112xTetO-Tel6R TetR-RFP / MS2-GFP	Mat A ura 3-52 trp1-Δ63 leu2-Δ1 2MS2::telomere6R 112xTetO-KAN::telomere6R TetR-RFP-NAT::chrVII YCPlac22 MS2-GFP	Cusanelli et al. (2013)
W303	Mat a, ura3-1, leu2-3, his3-11, trp1-1, ade2-1 bar1 Δ	
W303 112xTetO-Tel6R	Mat a, ura3-1, leu2-3, his3-11, trp1-1, ade2-1 bar1 Δ 112xTetO-KAN::telomere6R	This study
W303 112xTetO-Tel6R TetR-mCherry	Mat a, ura3-1, leu2-3, his3-11, trp1-1, ade2-1 bar1 Δ 112xTetO-KAN::telomere6R TetR- mCherry-NAT::chrVII	This study
W303 112xTetO- Tel6R TetR-mCherry Gal1p-Flp1	Mat a, ura3-1, leu2-3, his3-11, trp1-1, ade2-1 bar1 Δ 112xTetO-KAN::telomere6R TetR- mCherry-NAT::chrVII pFV17-Gal1p-Flp1::LEU2	This study
W303 112xTetO- Tel6R TetR-mCherry Gal1p-Flp1 225 (CTR)	Mat a, ura3-1, leu2-3, his3-11, trp1-1, ade2-1 bar1 Δ 112xTetO-KAN::telomere6R TetR- mCherry-NAT::chrVII pFV17-Gal1p- Flp1::LEU2 225-URA3::tel6R	This study
W303 112xTetO- Tel6R TetR-mCherry Gal1p-Flp1 229 (SHORT)	Mat a, ura3-1, leu2-3, his3-11, trp1-1, ade2-1 bar1 Δ 112xTetO-KAN::telomere6R TetR- mCherry-NAT::chrVII pFV17-Gal1p-Flp1::LEU2 229-URA3::tel6R	This study
W303 Gal1p-	Mat a, ura3-1, leu2-3, his3-11, trp1-1, ade2-1	This study

Flp1 225 (CTR)	bar1 Δ pFV17-Gal1p-Flp1::LEU2 225-URA3::tel6R	
W303 Gal1p- Flp1 229 (SHORT)	Mat a, ura3-1, leu2-3, his3-11, trp1-1, ade2-1 bar1 Δ pFV17-Gal1p-Flp1::LEU2 229-URA3::tel6R	This study
W303 Gal1p- Flp1 225 (CTR) MCD1-13MYC::KAN	Mat a, ura3-1, leu2-3, his3-11, trp1-1, ade2-1 bar1 Δ pFV17-Gal1p-Flp1::LEU2 225-URA3::tel6R MCD1-13MYC::KAN	This study
W303 Gal1p- Flp1 229 (SHORT) MCD1-13MYC::KAN	Mat a, ura3-1, leu2-3, his3-11, trp1-1, ade2-1 bar1 Δ pFV17-Gal1p-Flp1::LEU2 229-URA3::tel6R MCD1-13MYC::KAN	This study
W303 112xTetO- Tel6R TetR-mCherry Gal1p-Flp1 225 (CTR) sir2 Δ	Mat a, ura3-1, leu2-3, his3-11, trp1-1, ade2-1 bar1 Δ 112xTetO-KAN::telomere6R TetR- mCherry-NAT::chrVII pFV17-Gal1p- Flp1::LEU2 225-URA3::tel6R sir2::HYG	This study
W303 112xTetO- Tel6R TetR-mCherry Gal1p-Flp1 229 (SHORT) sir2 Δ	Mat a, ura3-1, leu2-3, his3-11, trp1-1, ade2-1 bar1 Δ 112xTetO-KAN::telomere6R TetR- mCherry-NAT::chrVII pFV17-Gal1p-Flp1::LEU2 229-URA3::tel6R sir2::HYG	This study
W303 112xTetO- Tel6R TetR-mCherry Gal1p-Flp1 225 (CTR) sir4 Δ	Mat a, ura3-1, leu2-3, his3-11, trp1-1, ade2-1 bar1 Δ 112xTetO-KAN::telomere6R TetR- mCherry-NAT::chrVII pFV17-Gal1p- Flp1::LEU2 225-URA3::tel6R sir4::HYG	This study
W303 112xTetO- Tel6R TetR-mCherry Gal1p-Flp1 229 (SHORT) sir4 Δ	Mat a, ura3-1, leu2-3, his3-11, trp1-1, ade2-1 bar1 Δ 112xTetO-KAN::telomere6R TetR- mCherry-NAT::chrVII pFV17-Gal1p-Flp1::LEU2 229-URA3::tel6R sir4::HYG	This study
W303 112xTetO- Tel6R TetR-mCherry Gal1p-Flp1 225 (CTR) rif1 Δ	Mat a, ura3-1, leu2-3, his3-11, trp1-1, ade2-1 bar1 Δ 112xTetO-KAN::telomere6R TetR- mCherry-NAT::chrVII pFV17-Gal1p- Flp1::LEU2 225-URA3::tel6R rif1::HYG	This study

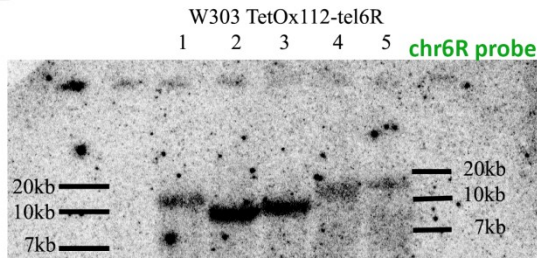
W303 112xTetO-Tel6R TetR-mCherry Gal1p-Flp1 229 (SHORT) rif1Δ	Mat a, ura3-1, leu2-3, his3-11, trp1-1, ade2-1 bar1 Δ 112xTetO-KAN::telomere6R TetR-mCherry-NAT::chrVII pFV17-Gal1p-Flp1::LEU2 229-URA3::tel6R rif1::HYG	This study
W303 112xTetO-Tel6R TetR-mCherry Gal1p-Flp1 225 (CTR) rif2Δ	Mat a, ura3-1, leu2-3, his3-11, trp1-1, ade2-1 bar1 Δ 112xTetO-KAN::telomere6R TetR-mCherry-NAT::chrVII pFV17-Gal1p-Flp1::LEU2 225-URA3::tel6R rif2::HYG	This study
W303 112xTetO-Tel6R TetR-mCherry Gal1p-Flp1 229 (SHORT) rif2Δ	Mat a, ura3-1, leu2-3, his3-11, trp1-1, ade2-1 bar1 Δ 112xTetO-KAN::telomere6R TetR-mCherry-NAT::chrVII pFV17-Gal1p-Flp1::LEU2 229-URA3::tel6R rif2::HYG	This study
W303 112xTetO-Tel6R TetR-mCherry Gal1p-Flp1 225 (CTR) pif1Δ	Mat a, ura3-1, leu2-3, his3-11, trp1-1, ade2-1 bar1 Δ 112xTetO-KAN::telomere6R TetR-mCherry-NAT::chrVII pFV17-Gal1p-Flp1::LEU2 225-URA3::tel6R pif1::HYG	This study
W303 112xTetO-Tel6R TetR-mCherry Gal1p-Flp1 229 (SHORT) pif1Δ	Mat a, ura3-1, leu2-3, his3-11, trp1-1, ade2-1 bar1 Δ 112xTetO-KAN::telomere6R TetR-mCherry-NAT::chrVII pFV17-Gal1p-Flp1::LEU2 229-URA3::tel6R pif1::HYG	This study
W303 <i>mcd1-1</i>	Mat a, ura3-1, leu2-3, his3-11, trp1-1, ade2-1 <i>mcd1-1</i>	Damien D'Amours
W303 112xTetO-Tel6R TetR-Mcd1	Mat a, ura3-1, leu2-3, his3-11, trp1-1, ade2-1 bar1 Δ 112xTetO-KAN::telomere6R TetR-mCherry-NAT::chrVII	This study
W303 112xTetO-Tel6R TetR-Mcd1	Mat a, ura3-1, leu2-3, his3-11, trp1-1, ade2-1 bar1 Δ 112xTetO-KAN::telomere6R TetR-mCherry-NAT::chrVII	This study
W303	Mat a, ura3-1, leu2-3, his3-11, trp1-1, ade2-1	This study

112xTetO-Tel6R TetR-Scc4	bar1 Δ 112xTetO-KAN::telomere6R TetR- mCherry-NAT::chrVII	
W303 112xTetO-Tel6R TetR-Scc4	Mat a, ura3-1, leu2-3, his3-11, trp1-1, ade2-1 bar1 Δ 112xTetO-KAN::telomere6R TetR- mCherry-NAT::chrVII	This study

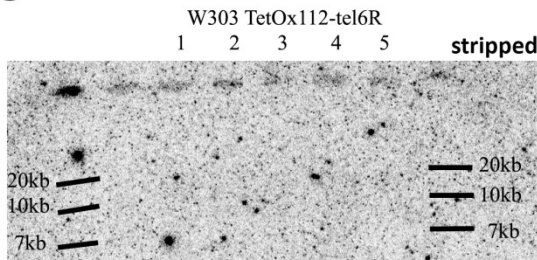
A



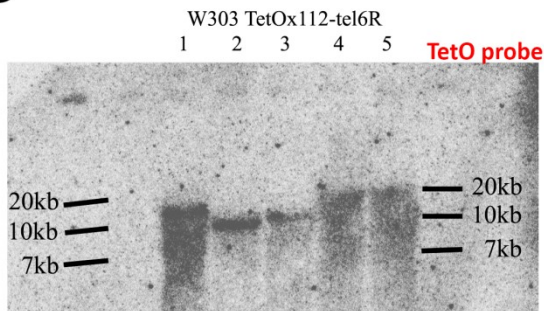
B



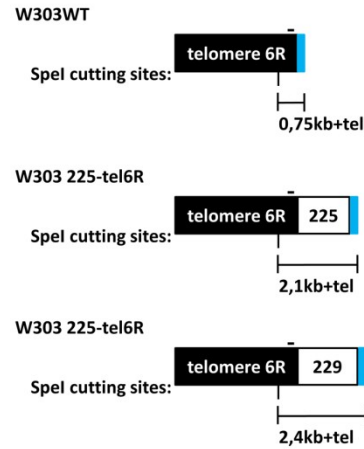
C



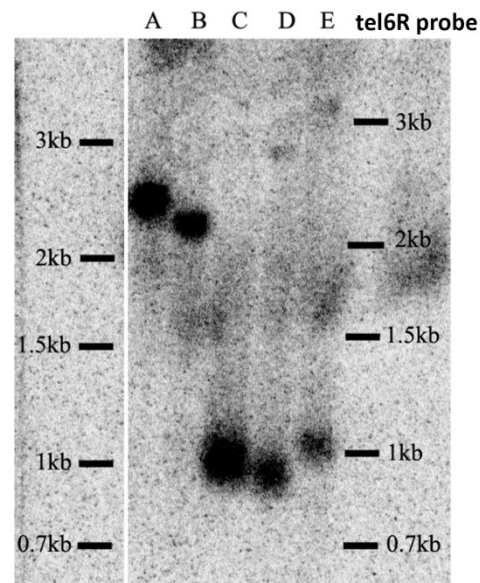
D



E



F



A: W303 TetOx112-229-tel6R (w/o Flp induction)
B: W303 TetOx112-225-tel6R (w/o Flp induction)
C: W303 WT
D: W303 TetOx112-229-tel6R (with Flp induction)
E: W303 TetOx112-225-tel6R (with Flp induction)

Figure S8. Southern blot validation of proper integration of the TetO and the telomere shortening system.

(A) Representation of the Southern experiment to visualise the integration of TetO repeats at tel6R. The Spel digestion sites and the expected size of Spel fragments are shown. In green is

the hybridization site of the chromosome 6 probe used to verify the integration of TetO repeats at telomere 6R. It is located just before the TetO integration site. In red is the hybridization site of the TetO probe used to verify the single integration of TetO repeats. **(B)** Southern blot of 5 clones with the chr6 probe showing the integration of TetO repeats at tel6R in the 5 clones. **(C)** Southern blot showing the proper stripping of the chr6 probe from the membrane shown in the panel B. **(D)** Subsequent Southern blot after the stripping shown in panel C with the TetO probe. It shows the single integration of TetO repeats at tel6R in the 5 clones with clone 1, 4 and 5 having a heterogeneous number of repeats integrated. **(E)** Representation of the Southern experiment to visualise the functionality of the tel6R shortening system. The 225 cassette represent the control cassette without telomeric repeats in it. The 229 cassette represent the cassette with 270bp of telomeric repeats. The SpeI digestion sites and the expected size of SpeI fragments are shown. In black is the hybridization site of the tel6R probe used to verify the size of the telomere end fragment containing the telomeric repeats. It is located just before the shortening cassette integration site. **(F)** Southern blot with the tel6R probe showing the integration of the 225 and 229 cassettes at tel6R in lane A and B. lane C shows a WT tel6R length. Lanes D and E show the final length of tel6R once, respectively, the 229 and 225 cassettes are removed by the Fip recombinase. The 229 cassette gives a shorter than WT tel6R.

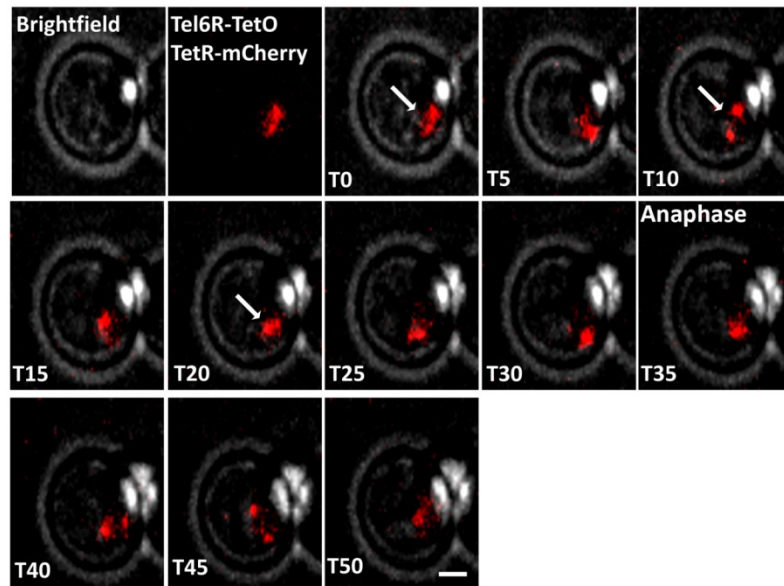


Figure S9. Time-lapse confocal imaging of an S phase cell showing transient telomere 6R doublet.

Time-lapse microscopy analysis shows transient tel6R doublet during S phase. Tel6R is labelled by the integration of a TetO array in the subtelomere region of tel6R and the expression of a TetR-mCherry fusion protein. The localisation of tel6R was analyzed by performing z stack acquisitions every 5 min and relevant Z steps are shown. White arrows indicate the time points at which tel6R doublets are detected. Scale bar = 1 μ m.

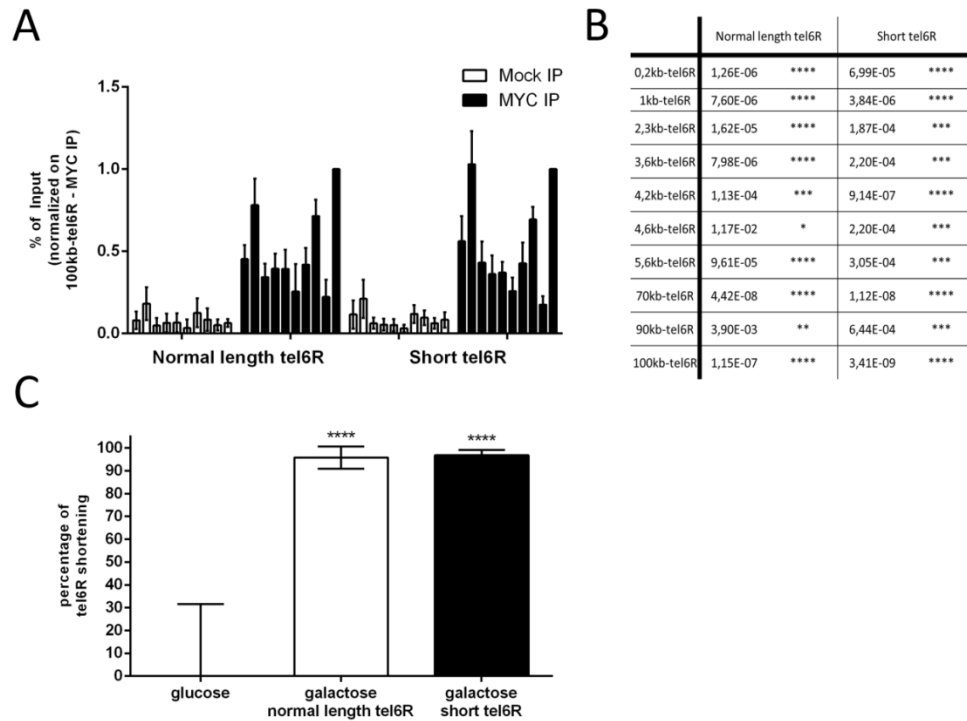


Figure S10. Validation of the efficiency of the ChIP and the tel6R inducible shortening system.

(A) Validation of the specificity of the anti-MYC immunoprecipitation. Samples presented in figure 31E were split in half and underwent a simultaneous Mock IP. Mcd1 enrichment is shown as % of input and is normalized on the enrichment at 100kb-tel6R in the MYC IP. The amplicons used are represented in figure 31D. Data shown represent mean \pm SD (N=7). **(B)** Statistical analysis of the panel A. P-values were calculated using unpaired t-test to compare the MOCK IP vs the MYC IP for each strain and each amplicon. **(C)** qPCR validation of the efficiency of the inducible shortening of tel6R. An amplicon was designed with a primer just before the first FRT site of the shortening cassette depicted in figure 31A and the other one in the *URA3* gene. In the absence of galactose-inducible tel6R shortening, qPCR performed on genomic DNA allows detection of this amplicon. As the expression of the FLP1 recombinase under the control of a galactose inducible promoter removes the binding site of the *URA3* primer, the efficiency of the shortening of the telomere 6R can be measured by the diminution of the abundance of this amplicon by qPCR. An amplicon in the *IRC7* gene, 5 kb downstream of the telomere 6R, was used for normalisation. Yeasts grown in glucose were used as a reference point. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, using unpaired t test.

5. Discussion

Dans le premier article, nous avons montré un nouveau trafic intranucléaire de l'ARN *TLC1* durant le cycle cellulaire et démontré l'implication de ce trafic pour restreindre l'activité de la télomérase. En effet, la séquestration de l'ARN *TLC1* dans le nucléole en phase G2/M semble jouer un rôle pour empêcher la télomérase d'interférer avec la machinerie de réparation homologue sur les cassures d'ADN. Les acteurs principaux de ce trafic sont l'hélicase Pif1, la SUMO ligase Siz1, les protéines de la HR Rad52 et Rad51 ainsi que la protéine télomérique Cdc13. Aussi, pour déterminer l'effet de la séquestration de l'ARN *TLC1* au nucléole sur l'ajout *de novo* de télomère, nous avons développé une nouvelle approche basée sur le séquençage à haut débit Illumina. L'implication de ces protéines et de cette technique sera discutée de façon plus détaillée ci-dessous.

Dans le second et le troisième article, nous avons étudié la régulation de TERRA, un ARN non-codant transcrit par les télomères et régulateur de la télomérase. Nous avons montré qu'au moment de la transition diauxique, la transcription de l'ARN TERRA est induite. Cette induction est accompagnée de la relocalisation de ces ARN au cytoplasme. La fonction de cette induction et relocalisation est encore inconnue. Nous avons aussi exploré le lien entre la longueur des télomères, la cohésion et la transcription télomérique. Les télomères courts, par un mécanisme dépendant de Sir4, induisent un défaut de cohésion en *cis* qui est nécessaire pour permettre l'expression de TERRA. Ces deux mécanismes de régulation de l'expression de TERRA seront discutés plus en détail ci-dessous.

5.1. La régulation en phase G2/M de la télomérase

Il est connu que la télomérase peut se localiser aux télomères en phase G1 et S du cycle cellulaire mais cela mène à l'élongation des télomères seulement en phase S. Cela démontre

une régulation en G1 pour inhiber l'activité de la télomérase. Cette régulation différentielle en phase G1 et S dépend de la phosphorylation de Cdc13 par les kinases Tel1 et Cdk1 (2, 133). Notre laboratoire a aussi démontré l'implication de TERRA et de la formation de T-Recs, une structure d'ordre supérieur de la télomérase, dans la régulation de l'activité de la télomérase durant la phase S (136, 168). Par contre, peu est connu sur la régulation de la télomérase en phase G2/M. Il a été démontré *in vitro* dans des cellules humaines que l'activité de la télomérase n'était pas diminuée en phase G2/M (491). Par contre, elle ne l'est pas non plus en phase G1 et la cellule repose sur d'autres mécanismes pour réguler l'activité de la télomérase aux télomères. La séquestration au nucléole de l'ARN *TLC1* représente donc un nouveau modèle quant à la régulation de la télomérase en phase G2/M, en ajout au désassemblage du complexe de la télomérase en fin de phase S.

5.2. Pif1 et la restriction de l'accès au substrat

Un des acteurs principaux du trafic nucléoplasmique de l'ARN *TLC1* est l'hélicase Pif1, qui est connue pour inhiber la localisation de la télomérase aux télomères et aux DSBs (381, 382). En l'absence de Pif1, la télomérase reste au nucléoplasme, probablement encore aux télomères. En effet, la délétion de *PIF1* entraîne un hyper allongement des télomères. Étant donné la fonction d'hélicase de Pif1, son effet sur le trafic de la télomérase est possiblement limité à la restriction de l'accès au substrat et pas directement à la translocation de l'ARN *TLC1* au nucléole. Il sera intéressant d'identifier par quel mécanisme supplémentaire l'ARN *TLC1* est activement localisé au nucléole.

En plus de son action aux télomères, Pif1 se localise aussi aux DSBs où sa fonction est identique et consiste à être une barrière au recrutement de la télomérase. Son rôle est primordial car la mutation de *pif1* induit, à elle seule, une augmentation supérieure à 500 fois du nombre d'addition de *nov*o de télomère aux DSBs. Son effet est additif à toutes les autres voies de régulation de l'ajout *de novo* de télomère démontrant son rôle unique. Son rôle a été

clarifié de façon élégante par les équipes du Dr. Durocher et du Dr. Chang (492). En effet, l'activité de Pif1 établit la limite entre ce qu'est un télomère et ce qu'est un DSB. Grâce à l'induction d'un DSB unique et à la modulation des séquences au site, ils ont démontré qu'il existe une limite précise au nombre de nucléotides TG au site de cassure et, au-dessus de cette limite, Pif1 n'a plus d'effet sur l'inhibition du recrutement de la télomérase (492). En effet, au-delà de 34pb de répétitions télomériques, la télomérase devient insensible à l'inhibition par Pif1 (492) (Fig.35). Cette longueur de 34pb servirait donc de limite pour discerner ce qui constitue un télomère en phase S. Il est proposé que cette limite représente le basculement où le recrutement de Cdc13, et donc le recrutement de la télomérase, devient supérieur à l'inhibition par Pif1 (492). Il est à noter que cette limite existe aussi au niveau des télomères extrêmement courts. En effet, les télomères <40pb démontrent un recrutement inefficace de la télomérase renforçant l'hypothèse d'une différenciation entre DSB et télomère selon la longueur de la séquence télomérique (492). Cela implique que l'induction de GCRs par la délétion ou mutation de *PIF1* provient de l'addition *de novo* de télomère à des sites possédant moins de 34 TG au site de cassure.

5.3. Les protéines de la recombinaison homologue et la régulation de l'ajout *de novo* de télomère

Des acteurs importants de la régulation du trafic de la télomérase sont les protéines de la HR. En présence de dommage à l'ADN, il y a une augmentation de la relocalisation nucléoplasmique de la télomérase démontrant qu'en présence de certaines cassures d'ADN, probablement des cassures non-réparables, l'ajout *de novo* de télomère peut être une stratégie de survie potentielle pour la cellule. Par contre, le nombre de cellules démontrant cette relocalisation est minime, suggérant qu'en conditions normales, et en présence de DSBs, l'accumulation de l'ARN *TLC1* au nucléole est maintenue pour favoriser les voies de réparations classiques qui ont lieu dans le nucléoplasme. Cette inhibition se fait par Rad52. En effet, après

Pif1, une des barrières importantes à l'ajout *de novo* de télomère et à la localisation nucléoplasmique de l'ARN *TLC1* est la protéine Rad52.

L'effet de la délétion de *RAD52* sur l'augmentation du nombre de GCR peut provenir de plusieurs fonctions inhibitrices de Rad52 et de la voie de HR. Une de ces fonctions est l'inhibition de la localisation nucléoplasmique de l'ARN *TLC1*. Cette fonction est, parmi les protéines de la HR, unique à Rad52 et passe par l'inhibition du recrutement de Cdc13 aux DSBs. En effet, la délétion d'autres protéines de la HR n'est pas suffisante pour induire une relocalisation de l'ARN *TLC1*. De plus, plusieurs d'entre elles suppriment l'effet de la délétion de *RAD52*, démontrant que certaines protéines, en plus de jouer un rôle dans la réparation classique des dommages à l'ADN, sont importantes pour l'ajout *de novo* de télomère. Parmi celles-ci se trouvent le complexe MRX et la kinase Tel1, dont leur rôle dans la promotion de l'ajout *de novo* de télomère était déjà suggéré par l'effet de leur délétion dans les essais GCR (374).

Par contre, l'effet supprimeur de la délétion de *RAD51* sur l'effet de la délétion de *RAD52* est surprenant. Étant toutes les deux centrales à la HR, il aurait été normal qu'elles possèdent un effet similaire. Au centre de cette opposition se trouve la protéine Cdc13, qui est importante pour le recrutement de la télomérase aux télomères et aux DSBs. En effet, le mutant *cdc13-2*, qui empêche l'interaction Cdc13-Est1, centrale au recrutement de la télomérase, supprime l'augmentation d'ajout *de novo* de télomère causée par la mutation de *pif1* (58, 384). Selon nos résultats, cette mutation empêche également la relocalisation de l'ARN *TLC1*, démontrant l'importance de l'interaction Cdc13-Est1 dans la régulation de ce processus. Étant donné le rôle central de Cdc13, il n'est pas étonnant que l'effet de Rad52 et de Rad51 passe par leur action sur celle-ci. La présence de Cdc13 aux DSBs avait déjà été démontrée par CHIP (232). Nous avons pu, par immunofluorescence (IF), confirmer la formation d'un focus Cdc13 aux DSBs chez environ 20% des cellules. Un des rôles de Rad52 serait donc d'inhiber l'accumulation de Cdc13 aux DSBs et ainsi l'empêcher de servir de plateforme pour le recrutement de la télomérase. En effet, la délétion de *RAD52* induit, non seulement une augmentation du nombre de cellules démontrant un focus Cdc13, mais la formation de focus plus gros et plus intense témoignant d'un nombre plus grand de protéines Cdc13 recrutées. Par contre, la délétion de

RAD51 entraîne l'effet opposé, inhibant de façon drastique le recrutement de Cdc13 aux DSBs, confirmant ainsi la dépendance de Cdc13 à Rad51 observé précédemment par ChIP (232). Étant donné que la délétion de *RAD51* supprime l'effet de la délétion de *RAD52* sur la localisation nucléoplasmique de l'ARN *TLC1*, les deux protéines semblent agir dans la même voie mais de façon opposée. Aussi, cela suggère que l'effet de Rad51 sur le recrutement de Cdc13 ne nécessite pas la présence ou l'action de Rad52.

Bien que le mode d'action de Rad51 pour permettre le recrutement de Cdc13 aux DSBs reste inconnu, l'effet inhibiteur de Rad52 pourrait être expliqué par son rôle dans la stabilisation de RPA sur l'ADN simple brin. En effet, il a été démontré qu'en l'absence de Rad52, l'association du complexe RPA avec l'ADN simple brin passe par différents cycles d'association-dissociation permettant ainsi son remplacement par d'autres complexes RPA ou d'autres protéines liant l'ADN simple brin tel Cdc13 (228, 229). Par contre, en présence de Rad52, l'interaction de RPA à l'ADN simple brin est stabilisée et ne permet plus de cycles d'association-dissociation (228, 229).

Récemment, des travaux du groupe de recherche du Dre. Friedman ont confirmé que Rad51 et Rad52 travaillent en opposition pour le recrutement de Cdc13 aux sites de cassures (493). Par contre, nos résultats divergent sur certains points, principalement dû à des raisons méthodologiques. Leurs résultats d'essai GCR montrent que la délétion de *RAD51* entraîne une diminution d'événements de GCR à un site d'une centaine de paires de bases riche en TG considérée comme étant un site préférentiel de GCR (493). Aussi, l'ajout de la délétion de *RAD52* restore le nombre de GCR au niveau basal (493). Leur modèle propose donc que Rad52 inhibe l'ajout *de novo* de télomère mais seulement en l'absence de Rad51 qui sinon, supprime l'effet de Rad52. De plus, par ChIP, bien qu'ils montrent la diminution déjà connue du recrutement de Cdc13 en l'absence de Rad51, ils ne voient pas d'augmentation de la présence de Cdc13 en l'absence de Rad52 (493).

Les données d'essai GCR publiées montrent une augmentation du nombre de GCR de près de 10x pour la délétion de *RAD51* et de plus de 100x pour la délétion de *RAD52* ce qui ne concorde pas avec la diminution observée dans cet article (384). Cette différence provient de la méthodologie employée et de la façon de rapporter les résultats. En effet, l'équipe de recherche

du Dre. Friedman procèdent à un essai GCR mais induisent une cassure à environ 3kb d'un site riche en nucléotides TG à l'aide d'une endonucléase (493). De plus, ils ne regardent pas les événements de GCR ayant lieu au site de cassure mais ceux ayant lieu à un site riche en nucléotides TG (493). Aussi, étant donné l'absence de différence significative entre leurs conditions sur le nombre d'événements de GCR, ils quantifient le pourcentage d'événements prenant lieu au site riche en nucléotides TG, du côté centromérique à celui-ci ou entre celui-ci et le site de cassure (493). Une diminution du pourcentage d'événement ayant lieu au site riche en nucléotides TG dans une condition ne signifie donc pas nécessairement une diminution globale de l'ajout *de novo* de télomère. On peut, par conséquent, remarquer dans leurs données brutes qu'en l'absence de Rad52, il y a une augmentation de nombre global d'événements d'ajout *de novo* de télomère. La délétion de *RAD51*, quant à elle, a un effet mineur sur le nombre total de GCR mais diminue drastiquement le nombre d'ajout *de novo* de télomère, induisant principalement des translocations et délétions. La délétion simultanée des deux protéines induit une diminution du nombre d'événement de GCR et d'ajout *de novo* de télomère par rapport à la délétion de *RAD52* seule, ramenant le niveau global à un niveau proche des cellules sauvages. Ces données sont donc compatibles avec notre modèle de régulation.

La différence entre nos résultats pour le recrutement de Cdc13 dans une souche délétée de *RAD52* peut être expliquée par la différence de technique. En effet, par microscopie nous détectons le recrutement et l'accumulation de Cdc13 sur possiblement de multiples sites tandis que par ChIP, ils ne mesurent que l'accumulation de Cdc13 sur une région de 500pb.

Malgré tout, ces résultats confirment un rôle de Rad51 dans le recrutement de Cdc13 ainsi qu'une opposition de Rad52 et Rad51 dans la régulation de cet événement. L'utilisation de techniques non biaisées d'induction et de détection des sites d'ajout *de novo* de télomère pourrait permettre de réconcilier les résultats obtenus par microscopie et par essai GCR induit à des sites génomiques précis, et ainsi arriver à un modèle unique de la régulation du recrutement de Cdc13 et de l'impact de celui-ci sur la localisation de la télomérase.

Une autre différence entre nos travaux est le type de dommage à l'ADN généré pour étudier l'ajout *de novo* de télomère. Ceux-ci peuvent être « propres » ou « encombrés » et cette

différence joue déjà un rôle dans le choix de voie de réparation. La bléomycine induit une cassure d'ADN doubles brin par la création de 2 cassures simple brin proches l'une de l'autre (494). Elle est aussi accompagnée par la formation d'intermédiaires réactifs induisant des modifications des bases, des modifications de la structure, des formations d'adduits et du pontage inter-brin (494). L'induction d'une cassure par endonucléase, quant à elle, produit une cassure propre. Étant donné que les sites de cassures encombrés inhibent les voies de réparation par ligation des extrémités et nécessite une résection et la présence du complexe MRX, il est possible que la régulation des GCRs soit différente aussi dépendamment du type de cassure, expliquant ainsi certaines différences entre les techniques (116, 117).

Par exemple, la délétion de *RAD52* a un effet marqué sur l'ajout *de novo* de télomère lors de l'essai GCR classique. Par contre, lors de l'induction d'une cassure par une endonucléase, l'effet de Rad52 sur l'ajout *de novo* de télomère n'est pas nécessairement visible (Fig.35). La régulation par Rad52 sur l'ajout *de novo* de télomère est donc peut-être différente selon le substrat. De plus, il est connu que Rad52 inhibe l'hyper-résection et que sa délétion favorise donc le SSA (495). Par contre, un mutant de *rad52* inhibant uniquement sa fonction d'inhibition de l'hyper-résection sans affecter ses propriétés de liaisons à RPA et Rad51 démontre une sensibilité altérée à différents agents inducteur de cassures. En effet, en affectant uniquement cette fonction, les cellules mutantes, comparativement aux cellules délétées, perdent leur sensibilité à l'hydroxyurée (HU), à la camptothécine et à la phléomycine tout en maintenant une sensibilité au méthanesulfonate de méthyle (MMS) (495). Ceci confirme que différents types de cassures ne nécessitent pas toutes les mêmes fonctions de Rad52 et que sa délétion peut avoir différents effets sur la réparation selon le type de cassure.

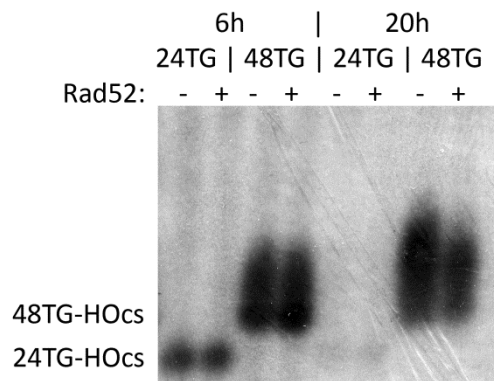


Figure 35. – Effet de la taille de la séquence TG au site de cassure et de la présence de Rad52 sur l'ajout *de novo* de télomère à un site de cassure induite par l'endonucléase HO.

L'expression de l'endonucléase HO est sous le contrôle d'un promoteur GAL1. La cassure d'ADN double brin est induite par ajout de galactose dans la culture. La présence du gène URA3 proche du site de cassure nous permet de suivre, par immunobuvardage de type Southern, l'ajout de novo de télomère, visible sous la forme d'une traînée au-dessus de la bande d'ADN. L'ajout de 24 ou 48 répétitions TG au site de cassure (24TG-HOcs ou 48TG-HOcs) permet de distinguer l'effet de ces séquences sur l'ajout de novo de télomère. Six heures après l'induction de la cassure, la cassure avec 48 répétitions TG est réparée par l'ajout de novo de télomère mais pas celle avec 24 répétitions TG. La délétion de RAD52 n'a pas d'effet additionnel sur le processus. Après plusieurs divisions cellulaires (20h post-induction), les cellules possédant seulement 24 répétitions TG au site de cassure ont soit réparés leur cassure d'une autre façon ou sont mortes, expliquant la perte du signal sur le Southern.

5.4. La SUMOylation et le trafic nucléoplasmique de l'ARN *TLC1* en réponse aux dommages à l'ADN

Dans le cas de DSBs non réparables, la cellule peut favoriser la réparation par GCR. Parmi les mécanismes favorisant cela, il y a la relocalisation à la membrane nucléaire qui inhibe la HR

et donc pourrait être impliquée dans la levée de l'inhibition par Rad52. Nous avons découvert un nouvel acteur dans ces processus, la SUMO ligase Siz1. En effet, en présence de DSBs, le relâchement de l'ARN *TLC1* dans le nucléoplasme dépend de Siz1. L'implication de Siz1, et non de Siz2, dans ce processus est, en soit, particulière.

En effet, Siz1 et Siz2 sont responsables de près de 99% de la SUMOylation chez *S. cerevisiae* (272). Ces deux SUMO ligases se partagent également la majeure partie des substrats et ont souvent des fonctions redondantes (272). Par contre, au niveau de la réparation de l'ADN, Siz2 et Mms21 semblent être plus importantes que Siz1. En effet, la majeure partie de la SUMOylation en réponse aux dommages à l'ADN tel que pour les protéines Rad52, Rad59 et le complexe RPA est effectué par Siz2 uniquement (496). Mms21 possède moins de substrats mais est tout aussi importante que Siz2 dans la réponse aux dommages à l'ADN. En effet, sa mutation induit une augmentation de près de 100x du nombre de GCR observés (384). Étant donné l'implication de Siz2 dans la signalisation durant la réponse aux dommages à l'ADN, il est surprenant de ne voir aucun effet de sa délétion sur le nombre de GCR observé (384). Cela peut être dû à une redondance entre les E3 SUMO ligases ou, bien qu'impliquée dans la réparation canonique des DSBs, elle joue aussi un rôle dans l'ajout *de novo* de télomère. Aussi, l'effet de la SUMOylation, par exemple sur Rad52, n'influence que de façon mineure la réparation. En effet, la SUMOylation de Rad52 n'affecte ni son aptitude à lier Rad51 ou le complexe RPA et n'affecte que de façon mineure son affinité pour l'ADN simple brin et double brin (497). La SUMOylation de Rad52 par Siz2 joue plus un rôle dans le choix de la voie de réparation utilisée que dans la réparation en tant que telle, ce qui peut expliquer l'absence d'effet dans l'essai GCR (497).

La délétion de *SIZ1* augmente le nombre de GCRs de 2 à 3 fois, mais aucune cible non-redondante avec les autres SUMO ligases n'est actuellement connue à l'exception de PCNA (384, 498). PCNA joue un rôle central dans la réparation post-répllicative. Sa mono- ou poly-ubiquitination sert de signal pour basculer entre le recrutement de polymérases de translésion et le mode de « bypass » sans erreur par changement de brin matrice respectivement (498). La SUMOylation de PCNA par Siz1 favorise le recrutement de Rad6 et Rad18, responsables de la mono-ubiquitination de PCNA en plus de recruter Srs2, responsable de l'inhibition de la HR (498). La délétion de *SIZ1* entraîne donc plus de GCR par dérégulation de la réparation post-

répllicative (498). Dans cet article, nous fournissons un nouveau rôle unique à Siz1 dans la régulation des GCRs.

À part le rôle de Pif1, le mécanisme par lequel la télomérase est localisée au nucléole en G2/M est encore inconnu. Par contre, nous savons qu'en présence de dommages à l'ADN, l'action de Siz1 interfère avec ce processus. Comment Siz1 permet le relâchement de l'ARN *TLC1* du nucléole? Cette question est encore ouverte et l'établissement de la cible de Siz1 sera important pour établir la mécanistique de cette dynamique. Une cible potentielle pourrait être Cdc13, qui est connue pour être SUMOylée et pourrait servir de signal moléculaire pour le relâchement de la télomérase (134). En effet, la présence d'un mutant de *cdc13* ne permettant pas l'interaction avec Est1 ne permet pas la relocalisation de l'ARN *TLC1* au nucléoplasme en présence de dommage à l'ADN. Par contre, celle-ci est une cible redondante de Siz1 et Siz2 et non une cible unique de Siz1 (134). On ne peut pas non plus exclure une possible SUMOylation des sous-unités de la télomérase comme cible potentielle ou d'une protéine nucléolaire. L'établissement de l'interactome de la télomérase spécifiquement en phase G2/M permettrait de trouver de possibles partenaires d'interaction nucléolaire qui permettent sa séquestration et d'élucider le rôle précis de Siz1 dans ce processus.

5.5. L'établissement d'une méthode de séquençage haut débit pour identifier les événements d'ajout *de novo* de télomère

L'étude des GCRs est compliquée par le fait de la rareté ces événements et de la grande variabilité, dans une même condition, du nombre d'événements détectables. Les techniques d'essai de GCR et d'induction de cassure par une endonucléase sont les principales techniques utilisées pour étudier ces processus. Chacune des techniques est utile pour répondre à différentes questions mais elles possèdent leurs faiblesses.

L'essai GCR permet d'étudier l'impact de délétions, d'ajout ou de retrait de séquences dans la zone étudiée sur le nombre de GCRs. Cet essai permet aussi d'étudier les effets sur le

nombre de GCRs totaux, en plus de permettre de distinguer entre translocations, duplications, délétions et ajout *de novo* de télomère. Par contre, pour pallier au problème de rareté des événements, une pression de sélection doit être appliquée, sélectionnant ainsi les événements « viables » et perdant ainsi une partie des événements menant à une perte de viabilité. Aussi, pour effectuer une sélection, la zone génomique étudiée doit être restreinte à quelques kilobases d'un seul bras d'un seul chromosome. Cette restriction fait aussi apparaître des sites préférentiels d'ajout *de novo* de télomère. Mais, en l'absence d'une pression de sélection pour les événements qui se passent dans cette région et qui entraîne la survie, sont-ils vraiment des sites préférentiels?

L'induction d'une cassure à un site précis permet de moduler précisément le contexte génomique de la cassure et d'étudier l'effet des modifications sur l'ajout *de novo* de télomère. Par contre, ces études sont restreintes à un seul contexte génomique à la fois, bien que le site puisse être déplacé. Ainsi, la nécessité d'une séquence précise proche d'un site de cassure peut être vraie dans le contexte génomique du site de cassure étudié. Par contre, à un autre endroit du génome, le contexte (transcription, marques d'histones, compaction de la chromatine, localisation, etc.) peut être différent et permettre l'ajout *de novo* de télomère même en l'absence de cette dite séquence. Ceci peut expliquer quelques divergences entre résultats comme la différence de l'importance de Rad52 sur l'inhibition de l'ajout *de novo* de télomère entre les essais GCR et l'induction de cassure par endonucléase (Fig.35).

Dans notre étude, nous avons développé une nouvelle technique pour passer outre les problèmes décrits ci-dessus. Cette technique repose sur le séquençage Illumina et comprend une analyse semi-automatisée pour identifier les événements d'ajout *de novo* de télomère. Cette méthode permet de détecter les événements dans tout le génome, à l'exception des séquences sous-télomériques dont la redondance des séquences complique l'attribution des fragments séquencés à un sous-télomère précis. Aussi, tous les événements, peu importe s'ils induisent la mort cellulaire ou la survie, sont détectés, permettant ainsi une évaluation moins biaisée de la prévalence de ces phénomènes.

La fréquence de GCR pour l'essai classique GCR pour des levures sauvages est de $3,5 \times 10^{-10}$ pour une séquence de 12kb. L'extrapolation de cette fréquence pour le génome entier de levure serait donc autour de $3,5 \times 10^{-7}$. Pour le séquençage Illumina, 1µg d'ADN génomique a été envoyé ce qui correspond à l'ADN d'environ $7,7 \times 10^7$ cellules et 2 événements ont été détectés pour des levures sauvages, donnant ainsi des fréquences similaires. Par contre, l'ADN entier de l'échantillon n'est pas séquencé et étant donné le nombre de séquences obtenu pour l'échantillon, le séquençage fourni une couverture génomique correspondant à entre 100 et 300 génomes. Cette méthode démontre donc que l'ajout *de novo* de télomère est un événement qui se passe plus souvent que précédemment estimé mais, qu'étant donné la perte de gènes encourue, les cellules meurent ou sont moins bien adaptés pour la survie. Confirmant cela, 92% des événements détectés par séquençage de l'ADN génomique sont en amont de gènes essentiels et auraient donc induit la mort cellulaire. Ce pourcentage est en accord avec la proportion du génome qui est en amont de tout gène essentiel (90%) (499).

L'étude des séquences ayant permis un ajout *de novo* de télomère confirme un fort biais pour les sites ayant une courte séquence d'environ 6 nucléotides TG au site de cassure. Ceci confirme les modèles actuels. Par contre, on remarque que certains sites, même en l'absence de séquence TG au site de cassure, ont servi de substrat pour la télomérase montrant que ce critère n'est pas une condition *sine qua non* et suggère que d'autres critères supplémentaires établissent les prérequis du contexte génomique pour permettre l'addition *de novo* de télomère. Un de ces critères supplémentaires pourrait être la présence d'une deuxième séquence riche en TG en amont du site de cassure servant de plateforme de recrutement de Cdc13. En effet, les événements détectés montrent la présence de régions TG riches dans les 2kb autour de la séquence (Fig.36C).

De plus, bien que le nombre d'évènements soit peut-être trop petit, nous n'avons pas détecté de régions génomiques démontrant un biais pour l'ajout *de novo* de télomère (Fig.36A). 66% des sites sont dans des ORFs, 23% dans des UTRs et 11% dans des régions non transcrites. Ces chiffres sont similaires aux chiffres trouvés dans la littérature (72% du génome est composé d'ORFs; 13% d'UTRs et 11% de régions non-transcrites) témoignant de l'absence de biais pour ces caractéristiques génomiques (500, 501). Dernièrement, les DSB se produisant dans l'ADN

ribosomal sont connues pour être déplacées en périphérie du nucléole pour être réparées par la machinerie de réparation des cassures d'ADN conventionnelle (290). Cette translocation, chez l'humain, nécessite la détection et la signalisation effectuée par le complexe MRN (MRX chez la levure) et les kinases ATM et ATR (Tel1 et Mec1 chez la levure) et entame les processus de translocation, de répression transcriptionnelle de l'ADN ribosomal et de réparation (290). Par contre, en opposition aux voies de réponses aux dommages à l'ADN conventionnelles, la signalisation n'entraîne pas d'activation de Chk1 et Chk2 (Chk1 et Rad53 chez la levure) ni d'arrêt du cycle cellulaire (290). Il n'était donc pas clair si l'ADN ribosomal est protégé de la télomérase, comme elle l'est de Rad52, ou si la localisation en G2/M de l'ARN *TLC1* au nucléole rend l'ADN ribosomal plus susceptible à l'ajout *de novo* de télomère. Grâce à notre méthode, nous pouvons démontrer que l'ADN ribosomal peut être un substrat de la télomérase, mais qu'il n'y a aucun biais positif ou négatif envers lui (Fig.36A-B). L'ajout *de novo* de télomères dans l'ADN ribosomal doit donc se passer à l'extérieur du nucléole, comme leur réparation conventionnelle. L'ajout *de novo* de télomères à l'intérieur du nucléole est sûrement inhibé par l'absence de Est2 dans le complexe de la télomérase en G2/M.

En conclusion, bien qu'il soit nécessaire d'augmenter le nombre d'événements analysés pour tirer des conclusions fiables, la puissance du séquençage Illumina pour l'analyse de l'ajout *de novo* de télomère est sans équivoque et démontre déjà son potentiel. Il serait aussi potentiellement intéressant d'appliquer la technique à différentes conditions. L'analyse des sites sous-télomériques reste toujours problématique. Par contre, l'utilisation de séquençage nano-pore, avec de plus longues séquences, pourrait faciliter leur étude.

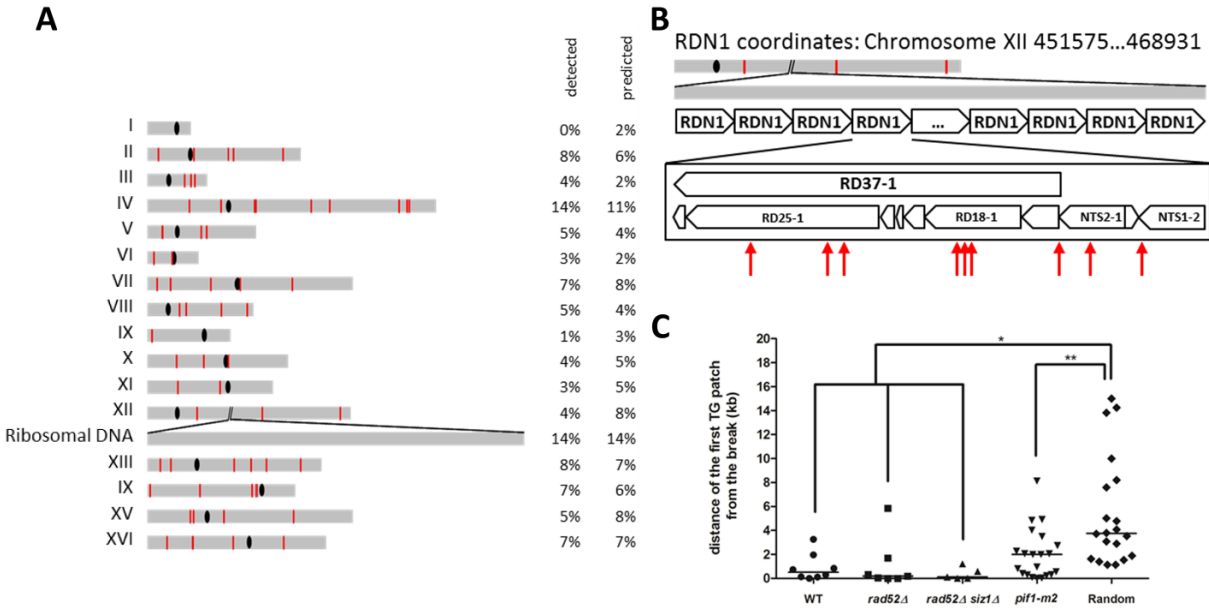


Figure 36. – Analyse de l’emplacement des sites d’ajout *de novo* de télomère détectés par séquençage Illumina de l’ADN génomique.

(A) Schématisation du génome de *Saccharomyces cerevisiae* avec l’emplacement des événements d’ajout *de novo* de télomère détectés en rouge et des centromères en noir. Les pourcentages sous la colonne détectée (detected) représentent les pourcentages d’évènement d’ajout *de novo* de télomère détecté par chromosome. La colonne prédiction (predicted) représente la proportion du génome de chaque chromosome et représente le pourcentage d’évènement d’ajout *de novo* de télomère en l’absence de biais envers certains chromosomes. Les répétitions de l’ADN ribosomal sont traitées séparément du chromosome XII et sont schématisés dans le panneau B. **(B)** Schématisation du locus ribosomal et de l’emplacement des événements d’ajout *de novo* de télomère détectés à l’intérieur de ce locus. **(C)** Distance entre le site d’ajout *de novo* de télomère et la première séquence d’au moins 3 répétitions TG₍₁₋₃₎ dans les différentes souches testées. Ces distances sont comparées avec la distance entre des coordonnées génomiques aléatoires et la première séquence d’au moins 3 répétitions TG₍₁₋₃₎.

5.6. La régulation de l'expression de TERRA par la cohésine

L'activité de la télomérase est délétère aux processus de réparation de l'ADN, ce qui explique que le recrutement et l'activité de la télomérase aux extrémités d'ADN sont fortement contrôlés. Par contre, la télomérase est nécessaire à l'entretien des télomères. De nombreux mécanismes sont mis en place pour réguler le recrutement et l'activité de la télomérase aux télomères. Parmi ceux-ci se trouve l'ARN TERRA qui permet de concentrer l'activité de la télomérase pour la cibler aux télomères courts (168). Bien que l'expression de TERRA soit fortement contrôlée, les télomères courts échappent à cette inhibition, permettant ainsi à TERRA d'effectuer sa fonction (165, 168). Afin de comprendre les fonctions de TERRA et son implication dans la régulation des processus qui ont lieu aux télomères, il est important de connaître comment son expression est régulée. Outre la répression transcriptionnelle effectuée par le complexe SIR et la dégradation par Rat1, de nouveaux régulateurs de l'expression de TERRA ont été identifiés (159, 165, 166). Par exemple, les complexes TRAMP et PAF1 participent aussi à la régulation de cet ARN non-codant en induisant sa dégradation (164, 167).

Dans le manuscrit présenté dans le chapitre 4, nous montrons que la cohésion télomérique participe aussi à l'inhibition de l'expression de TERRA. En effet, les télomères courts démontrent une perte de cohésion et une augmentation de l'expression de TERRA. Cependant, les expériences de ChIP ne démontrent pas une perte d'enrichissement de la cohésine aux télomères, suggérant que l'inhibition de l'expression de TERRA nécessite sa fonction d'emprisonnement des chromatides et que la perte de cohésion observée aux télomères courts ne découle pas de l'altération du chargement de la cohésine mais d'une étape subséquente. Une régulation de l'acétylation de Smc3 ou de la déstabilisation de l'interaction entre Smc3 et Mcd1 par Wpl1-Pds5 sont de bons candidats comme étape régulée aux télomères en fonction de la longueur des télomères.

La régulation de l'expression génique par la cohésine a déjà été observée chez l'humain, la drosophile et la levure (327, 363-365, 370, 371). Chez l'humain, la cohésine, avec le répresseur transcriptionnel CTCF, sont retrouvés au niveau de la plupart des sous-télomères et

régule l'expression de TERRA (490). CTCF et la cohésine servent aussi, chez l'humain, de frontière entre l'hétérochromatine et l'euchromatine en limitant la propagation des marques d'histones (317, 326-331, 363). Chez la levure, aucune frontière de ce genre n'a été identifiée au niveau des télomères. Il est généralement accepté que la limite de la propagation de l'hétérochromatine sous-télomérique se fait par la compétition et la balance entre les activités de déacétylase de Sir2 et d'acétyl-transférase de Sas2 (38, 39). Par contre, l'effet de la cohésion sur la transcription sous-télomérique et sur l'expression de TERRA pourrait témoigner d'un rôle de la cohésine dans l'établissement d'une frontière. Ce rôle serait similaire à celui observé au site HMR où la cohésine y joue un rôle d'élément isolateur (366). De plus, l'expression du mutant *mcd1-1* entraîne une augmentation de la présence de la modification d'histone H4K16ac d'environ 1,5 fois dans les régions sous-télomériques (486). Il est donc possible que la cohésion télomérique inhibe l'expression de TERRA en limitant l'action de Sas2 ou d'autres acétyl-transférases et favoriserait la répression transcriptionnelle produite par le complexe SIR. Il est aussi possible que la cohésion télomérique limite l'accès de certains facteurs de transcriptions spécifiques à la chromatine. La comparaison de l'interactome de la cohésine aux télomères courts et aux télomères de taille normale pourrait permettre d'identifier les mécanismes par lesquels la cohésion influence la transcription de TERRA.

5.7. La régulation de la cohésion télomérique

Nous avons identifié Sir4 comme régulateur de la cohésion télomérique. En effet, en présence de la délétion de *SIR4*, un télomère court démontre une cohésion télomérique similaire à celle d'un télomère de taille normale. Étant donné le rôle de Sir4 dans le complexe SIR, il est surprenant que la délétion de *SIR2* n'ait aucun effet sur la cohésion aux télomères courts. Cela suggère que le rôle de Sir4 dans ces processus est indépendant de son rôle dans la désacétylation effectuée par le complexe SIR.

Une fonction de Sir4 est l'ancrage à la membrane des télomères via son interaction avec la protéine de la membrane nucléaire Mps3 (42, 154). Plusieurs voies de localisation membranaire des télomères existent et plusieurs sont partiellement redondantes. Par contre, en phase S, la délétion de *SIR4*, la délétion du domaine N-terminal nucléaire de Mps3 nécessaire à l'interaction avec Sir4 ou la surexpression d'un peptide soluble exprimant uniquement le domaine N-terminal de Mps3, entraînent tous une diminution de l'ancrage membranaire d'environ 20% des télomères (42, 154). Cette proportion est similaire au pourcentage de télomères courts présents dans une cellule. En effet, 15-28% des télomères expriment TERRA et environ 10% des télomères, principalement les plus courts, sont rallongés durant une même phase S (137, 168). Il est donc probable que les télomères ancrés à la membrane via une interaction entre Sir4 et Mps3 soient la même population de télomères exprimant TERRA et étant préférentiellement allongés. Nous proposons que, parmi les voies de localisation membranaire des télomères, Sir4 et Mps3 sont impliqués dans la localisation des télomères courts en particulier durant la phase S. De plus, nous proposons que cette localisation joue un rôle dans la perte de cohésion. En effet, Mps3 interagit physiquement avec plusieurs régulateurs de la cohésine comme Eco1, Pds5 et Smc3, en plus d'avoir une interaction génétique avec Wpl1 (353, 502-505). Mps3 interagit également physiquement avec Rfc2, Ctf18 et Ctf8, des sous-unités du facteur de transcription alternatif C (RFC) qui affectent l'établissement de la cohésion (503, 506-508). Ensemble, ces interactions font de Mps3 un site potentiel de régulation de la cohésion. Il sera intéressant d'étudier son implication et son rôle dans la régulation de la cohésion des télomères.

5.8. L'organisation structurelle télomérique comme régulateur de l'expression de TERRA

Comme expliqué précédemment, TERRA est régulé par plusieurs mécanismes dont plusieurs dépendent de la longueur des télomères. Par contre, le lien entre longueur des

télomères et expression de TERRA n'est pas toujours direct et, dans certaines conditions comme en présence de stress oxydatif, l'expression de TERRA n'est pas corrélée avec la longueur des télomères (164, 166, 509-512). La façon dont l'expression de TERRA est affectée dans ces conditions n'est pas connue. La régulation de l'expression de TERRA par la cohésion télomérique peut suggérer un rôle de l'organisation structurale des télomères dans l'activation de l'expression de TERRA indépendamment de la longueur des télomères. En effet, plusieurs évidences pointent vers un rôle de l'organisation structurale des télomères dans la répression transcriptionnelle. L'ancrage à la membrane nucléaire des télomères et la formation d'agrégats (clusters) télomériques influencent l'expression des gènes sous-télomériques, suggérant que ces mécanismes pourraient aussi réguler TERRA (70, 147-149). De plus, chez *S. pombe*, les cellules en quiescence démontrent une hyper-agrégation des télomères à la membrane et celle-ci est impliquée dans la répression de TERRA (412, 513).

L'organisation structurale du génome est maintenue par les complexes SMC (Structural maintenance complexes). Le complexe Smc5/6 et la cohésine sont retrouvés au niveau de la région sous-télomérique et leur présence affecte le TPE et l'expression de TERRA (473, 486). En effet, nos travaux ont aussi montré que le complexe Smc5/6 joue un rôle dans l'agrégation des télomères et le TPE, et un mutant d'une sous-unité de ce complexe (*nse3-1*) induit une augmentation de l'expression de TERRA et une diminution du TPE (473)(Annexe 1). Cela suggère que la structure des télomères et l'agrégation des télomères peuvent réguler l'expression de TERRA. De plus, le mutant de la cohésine *mcd1-1* entraîne une altération de la compaction et de l'ancrage à la membrane des télomères en plus d'entraîner une perte de cohésion des télomères (486). Ces phénotypes sont aussi accompagnés d'une augmentation de l'expression des gènes sous-télomériques et de TERRA (486). Ensemble, ces données et les nôtres suggèrent une implication des complexes SMC dans la régulation de l'expression de TERRA par leur effet sur l'organisation structurale des télomères.

Il est à noter que nos données montrent une régulation de la cohésion des télomères par des mécanismes dépendants de la longueur des télomères. Par contre, notre suggestion que la régulation de la cohésion passe par l'ancrage à la membrane nucléaire rend probable que différentes conditions autres que le raccourcissement des télomères peuvent engendrer le

même effet en permettant un ancrage à la membrane similaire. En effet, il existe différentes voies d'ancrage des télomères à la membrane et celles-ci sont partiellement redondantes (40, 42, 70, 141, 148-154). L'ancrage des télomères à Mps3 pourrait donc se passer indépendamment de la longueur des télomères par une de ces voies redondantes.

L'augmentation de l'expression de TERRA en réponse à certains stress et stimuli pourrait impliquer l'altération de l'organisation structurale des télomères (compaction, ancrage à la membrane, agrégation et cohésion) par des mécanismes impliquant les complexes SMC. Il sera intéressant d'étudier l'implication de ces mécanismes dans des conditions entraînant une augmentation de TERRA indépendamment de la longueur des télomères. Une de ces conditions est la transition diauxique et est discutée dans la section ci-dessous.

5.9. L'induction de TERRA durant la transition diauxique

Dans le second article présenté dans cette thèse, nous démontrons une régulation de l'expression de TERRA durant la transition diauxique. Cette transition métabolique est caractérisée par un ajustement du programme transcriptionnel majeur en réponse au stress provoqué par l'absence de glucose disponible comme source de carbone et en réponse au stress oxydatif provoqué par l'augmentation de la respiration cellulaire.

Le lien entre le métabolisme et TERRA avait déjà été suggéré par le groupe du Dre. Decottignies (509). En effet, des sites de liaison pour le facteur de transcription NRF1 ont été identifiés sur une majorité des sous-télomères chez l'humain (509). NRF1 est impliqué dans la régulation de gènes jouant un rôle dans la respiration cellulaire ainsi que dans la transcription et la réplication de l'ADN mitochondrial (514). La délétion de *NRF1* induit une diminution de l'expression de TERRA et la surexpression induit l'effet inverse (509). De plus, l'activité physique, un stimulus régulateur de NRF1, induit une augmentation de l'expression de TERRA dans les cellules musculaires (509). Ceci confirme le lien entre métabolisme respiratoire et expression de

TERRA et peut suggérer un rôle protecteur de TERRA en réponse aux changements métaboliques.

D'autres groupes ont, par la suite, confirmé un lien entre TERRA et le stress oxydatif (510, 511). Ainsi, le traitement avec du peroxyde d'hydrogène induit l'expression de TERRA chez des cellules épithéliales alvéolaires humaines et murines (510). Cette augmentation est corrélée avec une diminution de la croissance et une augmentation de l'apoptose (510). L'inhibition de TERRA supprime ces effets, suggérant un lien entre la réponse au stress oxydatif, la régulation de l'expression de TERRA et le sort des cellules (510). Un autre groupe a aussi récemment montré l'induction de TERRA suite à l'exposition au peroxyde d'hydrogène chez des cellules embryonnaires rénales ainsi que suite à l'augmentation du stress oxydatif créé par l'augmentation de la respiration mitochondriale induite par l'hypothermie dans les tissus adipeux bruns chez la souris (511). Cette induction de TERRA est accompagnée d'une augmentation de la marque épigénétique H3K9me3 au niveau des sous-télomères et d'une plus grande présence de HP1 γ suggérant une transcription active (511). De façon intéressante, les cellules ayant déjà subi un stress oxydatif démontrent une induction de TERRA plus rapide, un phénomène similaire à l'adaptation suite au stress (511, 515).

Chez la levure, le raccourcissement des télomères suite à la délétion de la télomérase induit une augmentation de l'expression de TERRA, une diminution de la répression des gènes sous-télomériques et une reprogrammation transcriptionnelle globale favorisant l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme mitochondrial et la respiration cellulaire (476). Effectivement, les régions sous-télomériques sont enrichies de gènes impliqués dans le métabolisme des sucres et le métabolisme mitochondrial (12, 516, 517). Ceci renforce l'idée d'un lien entre les télomères et le métabolisme.

5.10. L'induction de TERRA et la réponse au stress

Plusieurs stress comme le choc thermique, la restriction métabolique et le choc osmotique stimulent la voie centrale de réponse au stress environnemental (ESR). Celle-ci induit une diminution de la synthèse protéique globale, une augmentation de la synthèse de chaperonnes, la modulation du métabolisme cellulaire, un ralentissement du cycle cellulaire et une stimulation des défenses cellulaires contre les dommages à l'ADN (515). Ces changements permettent à la cellule de s'adapter à un changement environnemental. Au centre de la ESR se trouve un ajustement du programme transcriptionnel. Celui-ci se fait grâce à quelques facteurs de transcriptions, les plus importants étant les protéines Msn2 et Msn4 (515). La régulation de l'expression de TERRA durant la transition diauxique et en réponse au stress oxydatif peut s'expliquer par la présence de plusieurs sites de liaison pour ces facteurs de transcription au niveau des sous-télomères. En effet, plusieurs facteurs de transcriptions montrent une liaison aux sous-télomères qui est augmentée en présence de stress, notamment Msn4 et Yap6, impliqués dans la ESR (517). Ces données soulèvent la possibilité que la régulation de l'expression de TERRA en transition diauxique fait partie d'une réponse plus large au stress. En effet, il a été montré qu'une augmentation de l'expression de TERRA en présence de stress cellulaires est liée à l'adaptation métabolique suite au manque de glucose, au stress oxydatif ainsi qu'au stress thermique (509-512). Il est aussi possible que la régulation en réponse au stress passe par la régulation de l'organisation structurale des télomères comme expliqué précédemment.

De plus, chez l'humain, l'expression de TERRA est augmentée en réponse aux dommages à l'ADN et joue possiblement un rôle dans la protection contre les agents mutagènes, considérant que la déplétion de TERRA entraîne l'activation de la réponse aux dommages à l'ADN à plusieurs sites non-télomériques (518, 519). Également chez l'humain, TERRA se retrouve aussi dans des exosomes et participe à la réponse inflammatoire, augmentant ainsi le nombre de stress induisant la transcription de TERRA (520). Il sera intéressant d'établir la fonction de TERRA dans la réponse au stress. Ces sujets seront développés ci-dessous.

5.11. Les rôles de TERRA dans la réponse au stress

Les télomères sont une cible préférentielle des dommages oxydatifs dû à leur composition riche en guanine et leur localisation en périphérie du noyau. En effet, les molécules oxydantes sont principalement produites à l'extérieur du noyau et donc, lorsque ces molécules entre dans le noyau, elles rencontrent en premier l'ADN localisé à la membrane nucléaire. La transcription de TERRA pourrait jouer un rôle dans la protection des télomères de plusieurs façon. Premièrement, suite aux dommages, une transcription accrue pourrait augmenter la détection et la réparation des dommages par les voies de réparation par excision des nucléotides, couplée ou non à la transcription (BER et TC-NER) et ainsi empêcher que ces dommages nuisent à la réplication (521-524). En effet, les dommages oxydatifs aux télomères peuvent induire des arrêts des fourches de réplication (525). Il est aussi connu que la transcription de TERRA facilite la réplication en délogeant des protéines fixées à l'ADN, particulièrement en conditions de stress (457). Si les télomères sont la cible de plusieurs dommages à l'ADN, plusieurs protéines de réparation sont recrutées aux télomères, ce qui peut constituer un obstacle aux fourches de réplication. La transcription télomérique pourrait donc aussi aider à la réplication des télomères en enlevant ces protéines recrutées aux télomères. Outre les effets *in cis* pour promouvoir la réparation et la réplication des télomères, une autre fonction possible de l'augmentation de la transcription de TERRA pourrait être de diminuer les chances de dommages aux télomères en les « diluant » avec une grande quantité d'ARN TERRA. L'ARN, comme l'ADN est susceptible d'être oxydé (526, 527). L'oxydation de l'ARN peut entraîner des défauts dans la traduction des ARN messagers et dans la fonction des ARN non-codants (526, 527). Étant donné la localisation cytoplasmique et l'abondance des ARN, ils sont beaucoup plus ciblés par les ROS (526, 527). Par contre, lorsque les ROS se rendent jusqu'au noyau, l'ADN, et particulièrement les télomères, sont à risque (528, 529). Une façon de diminuer les dommages aux télomères serait d'augmenter les chances que les ROS réagissent avec une molécule d'ARN en augmentant la transcription localisée. De façon intéressante, l'hypothèse que TERRA pourrait servir de tampon envers les ROS pour servir de défense aux télomères a déjà été proposée (509, 530). Pour vérifier cette théorie, il serait intéressant de

vérifier la présence de 8-oxoG sur TERRA dans ces conditions et déterminer si l'inhibition de la transcription de TERRA induit une plus grande présence de ces modifications sur les télomères.

TERRA est aussi impliquée, chez l'humain, dans la régulation *in trans* de l'expression génique. En effet, dans les cellules embryonnaire de souris, il a été montré que TERRA peut lier d'autres régions génomiques et sa diminution induit une dérégulation de l'expression de ses gènes cibles (170). TERRA peut interagir avec plusieurs facteurs épigénétiques tels que ATRX, PRC2, HP1 α et SUV39H1 (170, 467, 531-534). Il se peut donc que TERRA, en se localisant à d'autres régions génomiques et en interagissant avec des facteurs de transcription ou des modificateur épigénétiques, joue un rôle dans la changement du programme transcriptionnel en réponse au stress chez l'humain. Par contre, chez la levure, le faible nombre de molécule de TERRA par cellule rend cette fonction moins probable. Il n'y a aussi aucune étude démontrant une régulation de l'expression génique par TERRA chez la levure. Aussi, une fonction de régulateur épigénétique n'expliquerait pas la localisation cytoplasmique observée en transition diauxique chez la levure.

5.12. La localisation de TERRA au cytoplasme

Les fonctions possibles de TERRA décrites ci-dessus impliquent plus un rôle de la transcription de TERRA plutôt qu'une fonction des molécules de TERRA. Dans ces cas, la cellule n'a pas besoin des molécules de TERRA produites. Aussi, en situation normale, la quantité de TERRA produite est contrôlée par plusieurs mécanismes et sa surexpression ou la diminution de son expression interfère avec les fonctions télomériques normales. Étant donné que les fonctions proposées de TERRA sont toutes nucléaires, il est possible que la localisation de TERRA au cytoplasme témoigne d'un besoin de la transcription télomérique sans besoin de fonctions supplémentaires de TERRA. La régulation de sa localisation serait donc ici une façon d'empêcher une concentration locale élevée de TERRA pouvant interférer avec ses fonctions aux télomères. Il serait donc intéressant de vérifier si les molécules de TERRA au cytoplasme y sont envoyées

afin d'être séquestrées. La colocalisation de TERRA aux granules de stress ou aux « P-bodies » pourrait aider à clarifier cette hypothèse. Par contre, il est peu probable que la localisation au cytoplasme de TERRA soit liée à sa dégradation. En effet, en utilisant le mutant de l'ARN polymérase II *rpb1-1*, pour inhiber la transcription de TERRA, la demi-vie de TERRA n'est pas diminuée durant la transition diauxique.

Ce raisonnement pour expliquer la localisation de TERRA au cytoplasme s'applique aussi à la fonction proposée de TERRA comme tampon des dommages oxydatifs. De plus, la présence de 8-oxoG sur TERRA pourrait altérer ses fonctions. En effet, TERRA peut former des structures secondaires tel que des quadruplexes de guanines et l'oxydation de guanine peut affecter la formation de ces structures, et ainsi altérer ses interactions ARN-protéine et ses fonctions (530, 535, 536). Dans un tel cas, il serait normal de retirer les molécules de TERRA oxydées du noyau pour empêcher que celles-ci interfèrent avec d'autres fonctions.

On ne peut exclure la possibilité que TERRA jouerait un rôle encore inconnu dans le cytoplasme durant la transition diauxique et en réponse au stress oxydatif. Étant donné l'implication de la mitochondrie dans le métabolisme respiratoire et la production de ROS, il est possible que TERRA soit localisée à la mitochondrie pour y jouer un rôle. Un rôle de régulateur transcriptionnel ou de contrôle épigénétique des gènes mitochondriaux en réponse au stress serait une possibilité. L'étude de la colocalisation de TERRA avec les mitochondries durant la transition diauxique serait primordial pour confirmer ou non cette hypothèse.

6. Conclusion

Dans la première partie de la thèse, nos travaux ont démontré que la séquestration nucléolaire de l'ARN *TLC1* représentait un nouveau mode de régulation de l'activité de la télomérase en phase G2/M et en présence de dommage à l'ADN. Nous y avons identifié un rôle joué par Rad52 et Rad51 sur l'accumulation de Cdc13 aux sites de cassures. Bien que Rad52 et

Rad51 soient impliquées dans la réparation des cassures d'ADN par la recombinaison homologue, la délétion de ces protéines ne favorise pas la formation de GCR à des niveaux similaires, la délétion de *RAD52* entraînant un niveau plus élevé de GCR. Cette différence peut suggérer, par exemple, qu'en l'absence de *RAD51*, que des voies alternatives de recombinaison compensent la perte de Rad51, expliquant la diminution du nombre d'événements de GCR comparé à la délétion de *RAD52*. Nos données montrent que cette différence peut aussi être expliquée par le rôle que Rad51 dans l'accumulation de Cdc13 aux sites de cassures et dans l'ajout *de novo* de télomère. Le rôle de Rad52 sur l'inhibition de l'accumulation de Cdc13 aux sites de cassures peut être expliqué par son impact sur la dynamique de RPA sur l'ADN simple brin, mais le mécanisme par lequel Rad51 favorise l'accumulation de Cdc13 reste à être caractériser. Rad51 est aussi important pour le maintien des télomères en l'absence de la télomérase et des cellules murines délétées de *RAD51* montrent des télomères plus courts et des signes de fragilités télomériques (537), suggérant que les mécanismes identifiés entre Rad51 et Cdc13 au niveau de l'ajout *de novo* de télomère pourraient jouer un rôle au niveau des télomères.

La SUMOylation est une PTM importante dans le contrôle de la localisation des facteurs de réparation des cassures d'ADN. En effet, la SUMOylation permet l'ancrage des DSBs à différents sous-compartiments de la membrane nucléaire et permet l'exclusion nucléolaire de Rad52 et de la recombinaison homologue. Nos travaux ont montrés que la SUMOylation par Siz1 joue également un rôle dans la régulation de la localisation nucléolaire de l'ARN *TLC1*. L'indentification de la cible de Siz1 est la prochaine étape pour l'étude de la télomérase et de l'ajout *de novo* de télomère. En effet, connaître celle-ci permettrait d'établir les mécanismes de contrôle de la localisation nucléolaire de l'ARN *TLC1* et pourrait éventuellement représenter une cible potentielle d'inhibition de l'activité de la télomérase en permettant de contrôler sa séquestration nucléolaire.

Nos travaux ont aussi permis de développer une nouvelle technique fondée sur le séquençage haut-débit Illumina de l'ADN génomique pour la quantification et la caractérisation des événements d'ajout *de novo* de télomère. Cette technique devrait compléter les techniques standards utilisées dans ce domaine. L'utilisation de cette technique permettra de

mieux établir les conditions génomiques favorables à l'ajout *de novo* de télomère et de mieux comprendre les mécanismes régulant l'ajout *de novo* de télomère. Nos travaux ont, par exemple, permis de démontrer que la télomérase peut agir sur les cassures dans l'ADN ribosomal mais que la localisation nucléolaire de l'ARN *TLC1* en G2/M ne fait pas de l'ADN ribosomal un site préférentiel, suggérant que la télomérase y agit de façon similaire au reste du génome, probablement dans le nucléoplasme. Nos données obtenues grâce à cette technique clarifient les mécanismes de recrutement de la télomérase aux cassures d'ADN, appuyant un modèle à deux parties avec une séquence riche en nucléotides TG en amont du site de cassure permettant l'accumulation de Cdc13 et une courte séquence au site de cassure pour la liaison de la télomérase.

Dans la deuxième partie de la thèse, nous avons montré que les changements métaboliques et le stress oxydatif ont un impact sur la transcription de TERRA. Nos travaux s'ajoutent à un domaine d'étude grandissant qui montre que plusieurs stress cellulaires ont un effet sur l'expression de TERRA, plaçant possiblement TERRA comme un effecteur de la réponse au stress environnemental. Cependant le rôle précis de TERRA dans cette réponse n'est pas connu et reste à être étudié plus en détail. De plus, les fonctions de TERRA sont intrinsèquement liées à sa transcription et plusieurs données controversées existent quant aux rôles de TERRA, car sa transcription non-régulée nuit à la réplication et la stabilité des télomères. Il est donc important de comprendre les régulateurs endogènes de la transcription de TERRA. Comprendre les mécanismes régulant la transcription de TERRA en réponse au stress permettra une meilleure compréhension des conditions favorisant la transcription de TERRA et de mieux établir ses rôles.

Nous avons aussi montré que la cohésine et la cohésion télomérique sont des régulateurs de l'expression de TERRA. Les télomères courts démontrent une perte de cohésion prématurée qui induit l'expression de TERRA. Cette perte de cohésion est dépendante de Sir4 et suggère une implication de l'ancrage à la membrane nucléaire dans la régulation de la cohésion télomérique et de l'expression de TERRA. La cohésine et les complexes de la maintenance structurelle du génome (SMC) en général, par leur impact sur la compaction, la cohésion, l'agrégation et la localisation des télomères représentent de nouveaux régulateurs de la

transcription télomérique. Il sera intéressant d'étudier plus en détail l'impact de l'ancrage à la membrane sur ces mécanismes. La localisation à des sous-compartiments membranaires pourrait représenter une façon générale de réguler les processus prenant place au niveau des télomères. Nous pensons que la longueur des télomères pourrait influencer leur localisation à la membrane nucléaire. Cependant, il serait intéressant d'étudier si cette régulation de la localisation et de la transcription télomérique est exploitée dans d'autres conditions, telles qu'en présence de stress environnementaux et au cours des phases de croissance des levures.

7. Références bibliographiques

1. Wellinger RJ, Zakian VA. Everything you ever wanted to know about *Saccharomyces cerevisiae* telomeres: beginning to end. *Genetics*. 2012;191(4):1073-105.
2. Kupiec M. Biology of telomeres: lessons from budding yeast. *FEMS Microbiol Rev*. 2014;38(2):144-71.
3. Rai R, Zheng H, He H, Luo Y, Multani A, Carpenter PB, et al. The function of classical and alternative non-homologous end-joining pathways in the fusion of dysfunctional telomeres. *EMBO J*. 2010;29(15):2598-610.
4. Sfeir A, de Lange T. Removal of shelterin reveals the telomere end-protection problem. *Science*. 2012;336(6081):593-7.
5. Larrivee M, LeBel C, Wellinger RJ. The generation of proper constitutive G-tails on yeast telomeres is dependent on the MRX complex. *Genes Dev*. 2004;18(12):1391-6.
6. McEachern MJ, Blackburn EH. A conserved sequence motif within the exceptionally diverse telomeric sequences of budding yeasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(8):3453-7.
7. Dionne I, Wellinger RJ. Processing of telomeric DNA ends requires the passage of a replication fork. *Nucleic Acids Res*. 1998;26(23):5365-71.
8. Frank CJ, Hyde M, Greider CW. Regulation of telomere elongation by the cyclin-dependent kinase CDK1. *Mol Cell*. 2006;24(3):423-32.
9. Wright JH, Gottschling DE, Zakian VA. *Saccharomyces* telomeres assume a non-nucleosomal chromatin structure. *Genes Dev*. 1992;6(2):197-210.
10. Pryde FE, Louis EJ. *Saccharomyces cerevisiae* telomeres. A review. *Biochemistry (Mosc)*. 1997;62(11):1232-41.
11. Brigati C, Kurtz S, Balderes D, Vidali G, Shore D. An essential yeast gene encoding a TTAGGG repeat-binding protein. *Mol Cell Biol*. 1993;13(2):1306-14.
12. Brown CA, Murray AW, Verstrepen KJ. Rapid expansion and functional divergence of subtelomeric gene families in yeasts. *Curr Biol*. 2010;20(10):895-903.
13. Zhu X, Gustafsson CM. Distinct differences in chromatin structure at subtelomeric X and Y' elements in budding yeast. *PLoS One*. 2009;4(7):e6363.

14. Buchman AR, Kimmerly WJ, Rine J, Kornberg RD. Two DNA-binding factors recognize specific sequences at silencers, upstream activating sequences, autonomously replicating sequences, and telomeres in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 1988;8(1):210-25.
15. Konig P, Giraldo R, Chapman L, Rhodes D. The crystal structure of the DNA-binding domain of yeast RAP1 in complex with telomeric DNA. *Cell*. 1996;85(1):125-36.
16. Lieb JD, Liu X, Botstein D, Brown PO. Promoter-specific binding of Rap1 revealed by genome-wide maps of protein-DNA association. *Nat Genet*. 2001;28(4):327-34.
17. Conrad MN, Wright JH, Wolf AJ, Zakian VA. RAP1 protein interacts with yeast telomeres in vivo: overproduction alters telomere structure and decreases chromosome stability. *Cell*. 1990;63(4):739-50.
18. Wright JH, Zakian VA. Protein-DNA interactions in soluble telosomes from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*. 1995;23(9):1454-60.
19. Levy DL, Blackburn EH. Counting of Rif1p and Rif2p on *Saccharomyces cerevisiae* telomeres regulates telomere length. *Mol Cell Biol*. 2004;24(24):10857-67.
20. Marcand S, Gilson E, Shore D. A protein-counting mechanism for telomere length regulation in yeast. *Science*. 1997;275(5302):986-90.
21. Marcand S, Pardo B, Gratias A, Cahun S, Callebaut I. Multiple pathways inhibit NHEJ at telomeres. *Genes Dev*. 2008;22(9):1153-8.
22. Gotta M, Gasser SM. Nuclear organization and transcriptional silencing in yeast. *Experientia*. 1996;52(12):1136-47.
23. Hardy CF, Sussel L, Shore D. A RAP1-interacting protein involved in transcriptional silencing and telomere length regulation. *Genes Dev*. 1992;6(5):801-14.
24. Wotton D, Shore D. A novel Rap1p-interacting factor, Rif2p, cooperates with Rif1p to regulate telomere length in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev*. 1997;11(6):748-60.
25. Bonetti D, Clerici M, Anbalagan S, Martina M, Lucchini G, Longhese MP. Shelterin-like proteins and Yku inhibit nucleolytic processing of *Saccharomyces cerevisiae* telomeres. *PLoS Genet*. 2010;6(5):e1000966.
26. Hirano Y, Fukunaga K, Sugimoto K. Rif1 and rif2 inhibit localization of tel1 to DNA ends. *Mol Cell*. 2009;33(3):312-22.

27. Cornacchia D, Dileep V, Quivy JP, Foti R, Tili F, Santarella-Mellwig R, et al. Mouse Rif1 is a key regulator of the replication-timing programme in mammalian cells. *EMBO J.* 2012;31(18):3678-90.
28. Lian HY, Robertson ED, Hiraga S, Alvino GM, Collingwood D, McCune HJ, et al. The effect of Ku on telomere replication time is mediated by telomere length but is independent of histone tail acetylation. *Mol Biol Cell.* 2011;22(10):1753-65.
29. Kedziora S, Gali VK, Wilson RHC, Clark KRM, Nieduszynski CA, Hiraga SI, et al. Rif1 acts through Protein Phosphatase 1 but independent of replication timing to suppress telomere extension in budding yeast. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(8):3993-4003.
30. Hiraga SI, Monerawela C, Katou Y, Shaw S, Clark KR, Shirahige K, et al. Budding yeast Rif1 binds to replication origins and protects DNA at blocked replication forks. *EMBO Rep.* 2018;19(9).
31. Bianchi A, Shore D. Early replication of short telomeres in budding yeast. *Cell.* 2007;128(6):1051-62.
32. Sridhar A, Kedziora S, Donaldson AD. At short telomeres Tel1 directs early replication and phosphorylates Rif1. *PLoS Genet.* 2014;10(10):e1004691.
33. Liou GG, Tanny JC, Kruger RG, Walz T, Moazed D. Assembly of the SIR complex and its regulation by O-acetyl-ADP-ribose, a product of NAD-dependent histone deacetylation. *Cell.* 2005;121(4):515-27.
34. Moazed D, Rudner AD, Huang J, Hoppe GJ, Tanny JC. A model for step-wise assembly of heterochromatin in yeast. *Novartis Found Symp.* 2004;259:48-56; discussion -62, 163-9.
35. Tanny JC, Dowd GJ, Huang J, Hilz H, Moazed D. An enzymatic activity in the yeast Sir2 protein that is essential for gene silencing. *Cell.* 1999;99(7):735-45.
36. Hecht A, Strahl-Bolsinger S, Grunstein M. Spreading of transcriptional repressor SIR3 from telomeric heterochromatin. *Nature.* 1996;383(6595):92-6.
37. Ehrentraut S, Hassler M, Oppikofer M, Kueng S, Weber JM, Mueller JW, et al. Structural basis for the role of the Sir3 AAA+ domain in silencing: interaction with Sir4 and unmethylated histone H3K79. *Genes Dev.* 2011;25(17):1835-46.

38. Meijsing SH, Ehrenhofer-Murray AE. The silencing complex SAS-I links histone acetylation to the assembly of repressed chromatin by CAF-I and Asf1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 2001;15(23):3169-82.
39. Suka N, Luo K, Grunstein M. Sir2p and Sas2p opposingly regulate acetylation of yeast histone H4 lysine16 and spreading of heterochromatin. *Nat Genet.* 2002;32(3):378-83.
40. Taddei A, Hediger F, Neumann FR, Bauer C, Gasser SM. Separation of silencing from perinuclear anchoring functions in yeast Ku80, Sir4 and Esc1 proteins. *EMBO J.* 2004;23(6):1301-12.
41. Jaspersen SL, Giddings TH, Jr., Winey M. Mps3p is a novel component of the yeast spindle pole body that interacts with the yeast centrin homologue Cdc31p. *J Cell Biol.* 2002;159(6):945-56.
42. Bupp JM, Martin AE, Stensrud ES, Jaspersen SL. Telomere anchoring at the nuclear periphery requires the budding yeast Sad1-UNC-84 domain protein Mps3. *J Cell Biol.* 2007;179(5):845-54.
43. Wellinger RJ. The CST complex and telomere maintenance: the exception becomes the rule. *Mol Cell.* 2009;36(2):168-9.
44. Vodenicharov MD, Wellinger RJ. DNA degradation at unprotected telomeres in yeast is regulated by the CDK1 (Cdc28/Clb) cell-cycle kinase. *Mol Cell.* 2006;24(1):127-37.
45. Gao H, Cervantes RB, Mandell EK, Otero JH, Lundblad V. RPA-like proteins mediate yeast telomere function. *Nat Struct Mol Biol.* 2007;14(3):208-14.
46. Gelinas AD, Paschini M, Reyes FE, Heroux A, Batey RT, Lundblad V, et al. Telomere capping proteins are structurally related to RPA with an additional telomere-specific domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(46):19298-303.
47. Mersaoui SY, Bonnell E, Wellinger RJ. Nuclear import of Cdc13 limits chromosomal capping. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(6):2975-89.
48. Garvik B, Carson M, Hartwell L. Single-stranded DNA arising at telomeres in *cdc13* mutants may constitute a specific signal for the RAD9 checkpoint. *Mol Cell Biol.* 1995;15(11):6128-38.

49. Grandin N, Damon C, Charbonneau M. Cdc13 prevents telomere uncapping and Rad50-dependent homologous recombination. *EMBO J.* 2001;20(21):6127-39.
50. Weinert TA, Hartwell LH. Cell cycle arrest of cdc mutants and specificity of the RAD9 checkpoint. *Genetics.* 1993;134(1):63-80.
51. Grandin N, Damon C, Charbonneau M. Ten1 functions in telomere end protection and length regulation in association with Stn1 and Cdc13. *EMBO J.* 2001;20(5):1173-83.
52. Grandin N, Reed SI, Charbonneau M. Stn1, a new *Saccharomyces cerevisiae* protein, is implicated in telomere size regulation in association with Cdc13. *Genes Dev.* 1997;11(4):512-27.
53. Petreaca RC, Chiu HC, Nugent CI. The role of Stn1p in *Saccharomyces cerevisiae* telomere capping can be separated from its interaction with Cdc13p. *Genetics.* 2007;177(3):1459-74.
54. Xu L, Petreaca RC, Gasparyan HJ, Vu S, Nugent CI. TEN1 is essential for CDC13-mediated telomere capping. *Genetics.* 2009;183(3):793-810.
55. Rice C, Skordalakes E. Structure and function of the telomeric CST complex. *Comput Struct Biotechnol J.* 2016;14:161-7.
56. Lendvay TS, Morris DK, Sah J, Balasubramanian B, Lundblad V. Senescence mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with a defect in telomere replication identify three additional EST genes. *Genetics.* 1996;144(4):1399-412.
57. Evans SK, Lundblad V. Est1 and Cdc13 as comediators of telomerase access. *Science.* 1999;286(5437):117-20.
58. Nugent CI, Hughes TR, Lue NF, Lundblad V. Cdc13p: a single-strand telomeric DNA-binding protein with a dual role in yeast telomere maintenance. *Science.* 1996;274(5285):249-52.
59. Pennock E, Buckley K, Lundblad V. Cdc13 delivers separate complexes to the telomere for end protection and replication. *Cell.* 2001;104(3):387-96.
60. Qi H, Zakian VA. The *Saccharomyces* telomere-binding protein Cdc13p interacts with both the catalytic subunit of DNA polymerase alpha and the telomerase-associated est1 protein. *Genes Dev.* 2000;14(14):1777-88.

61. Sun J, Yang Y, Wan K, Mao N, Yu TY, Lin YC, et al. Structural bases of dimerization of yeast telomere protein Cdc13 and its interaction with the catalytic subunit of DNA polymerase alpha. *Cell Res.* 2011;21(2):258-74.
62. Grossi S, Puglisi A, Dmitriev PV, Lopes M, Shore D. Pol12, the B subunit of DNA polymerase alpha, functions in both telomere capping and length regulation. *Genes Dev.* 2004;18(9):992-1006.
63. Boulton SJ, Jackson SP. Identification of a *Saccharomyces cerevisiae* Ku80 homologue: roles in DNA double strand break rejoining and in telomeric maintenance. *Nucleic Acids Res.* 1996;24(23):4639-48.
64. Gravel S, Larrivee M, Labrecque P, Wellinger RJ. Yeast Ku as a regulator of chromosomal DNA end structure. *Science.* 1998;280(5364):741-4.
65. Roy R, Meier B, McAinsh AD, Feldmann HM, Jackson SP. Separation-of-function mutants of yeast Ku80 reveal a Yku80p-Sir4p interaction involved in telomeric silencing. *J Biol Chem.* 2004;279(1):86-94.
66. Marvin ME, Becker MM, Noel P, Hardy S, Bertuch AA, Louis EJ. The association of yKu with subtelomeric core X sequences prevents recombination involving telomeric sequences. *Genetics.* 2009;183(2):453-67, 1SI-13SI.
67. Marvin ME, Griffin CD, Eyre DE, Barton DB, Louis EJ. In *Saccharomyces cerevisiae*, yKu and subtelomeric core X sequences repress homologous recombination near telomeres as part of the same pathway. *Genetics.* 2009;183(2):441-51, 1SI-12SI.
68. Bonetti D, Clerici M, Manfrini N, Lucchini G, Longhese MP. The MRX complex plays multiple functions in resection of Yku- and Rif2-protected DNA ends. *PLoS One.* 2010;5(11):e14142.
69. Mimitou EP, Symington LS. Ku prevents Exo1 and Sgs1-dependent resection of DNA ends in the absence of a functional MRX complex or Sae2. *EMBO J.* 2010;29(19):3358-69.
70. Laroche T, Martin SG, Gotta M, Gorham HC, Pryde FE, Louis EJ, et al. Mutation of yeast Ku genes disrupts the subnuclear organization of telomeres. *Curr Biol.* 1998;8(11):653-6.

71. Stellwagen AE, Haimberger ZW, Veatch JR, Gottschling DE. Ku interacts with telomerase RNA to promote telomere addition at native and broken chromosome ends. *Genes Dev.* 2003;17(19):2384-95.
72. Fisher TS, Taggart AK, Zakian VA. Cell cycle-dependent regulation of yeast telomerase by Ku. *Nat Struct Mol Biol.* 2004;11(12):1198-205.
73. Chan A, Boule JB, Zakian VA. Two pathways recruit telomerase to *Saccharomyces cerevisiae* telomeres. *PLoS Genet.* 2008;4(10):e1000236.
74. Gallardo F, Olivier C, Dandjinou AT, Wellinger RJ, Chartrand P. TLC1 RNA nucleocytoplasmic trafficking links telomerase biogenesis to its recruitment to telomeres. *EMBO J.* 2008;27(5):748-57.
75. Telomeres and telomerase: Khan Academy; [Available from: <https://www.khanacademy.org/science/biology/dna-as-the-genetic-material/dna-replication/a/telomeres-telomerase>.
76. Lemieux B, Laterreur N, Perederina A, Noel JF, Dubois ML, Krasilnikov AS, et al. Active Yeast Telomerase Shares Subunits with Ribonucleoproteins RNase P and RNase MRP. *Cell.* 2016;165(5):1171-81.
77. Yulia V, Alexandra K, Raymund W. Telomerase in Space and Time: Regulation of Yeast Telomerase Function at Telomeres and DNA Breaks. 2020.
78. Lingner J, Cech TR, Hughes TR, Lundblad V. Three Ever Shorter Telomere (EST) genes are dispensable for in vitro yeast telomerase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(21):11190-5.
79. Lingner J, Hughes TR, Shevchenko A, Mann M, Lundblad V, Cech TR. Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science.* 1997;276(5312):561-7.
80. Harrington L, Zhou W, McPhail T, Oulton R, Yeung DS, Mar V, et al. Human telomerase contains evolutionarily conserved catalytic and structural subunits. *Genes Dev.* 1997;11(23):3109-15.
81. Nakamura TM, Morin GB, Chapman KB, Weinrich SL, Andrews WH, Lingner J, et al. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science.* 1997;277(5328):955-9.

82. Nugent CI, Lundblad V. The telomerase reverse transcriptase: components and regulation. *Genes Dev.* 1998;12(8):1073-85.
83. Tuzon CT, Wu Y, Chan A, Zakian VA. The *Saccharomyces cerevisiae* telomerase subunit Est3 binds telomeres in a cell cycle- and Est1-dependent manner and interacts directly with Est1 in vitro. *PLoS Genet.* 2011;7(5):e1002060.
84. Friedman KL, Cech TR. Essential functions of amino-terminal domains in the yeast telomerase catalytic subunit revealed by selection for viable mutants. *Genes Dev.* 1999;13(21):2863-74.
85. Friedman KL, Heit JJ, Long DM, Cech TR. N-terminal domain of yeast telomerase reverse transcriptase: recruitment of Est3p to the telomerase complex. *Mol Biol Cell.* 2003;14(1):1-13.
86. Singer MS, Gottschling DE. TLC1: template RNA component of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase. *Science.* 1994;266(5184):404-9.
87. Vasianovich Y, Wellinger RJ. Life and Death of Yeast Telomerase RNA. *J Mol Biol.* 2017;429(21):3242-54.
88. Mozdy AD, Cech TR. Low abundance of telomerase in yeast: implications for telomerase haploinsufficiency. *RNA.* 2006;12(9):1721-37.
89. Franke J, Gehlen J, Ehrenhofer-Murray AE. Hypermethylation of yeast telomerase RNA by the snRNA and snoRNA methyltransferase Tgs1. *J Cell Sci.* 2008;121(Pt 21):3553-60.
90. Chapon C, Cech TR, Zaugg AJ. Polyadenylation of telomerase RNA in budding yeast. *RNA.* 1997;3(11):1337-51.
91. Jamonnak N, Creamer TJ, Darby MM, Schaughency P, Wheelan SJ, Corden JL. Yeast Nrd1, Nab3, and Sen1 transcriptome-wide binding maps suggest multiple roles in post-transcriptional RNA processing. *RNA.* 2011;17(11):2011-25.
92. Noel JF, Larose S, Abou Elela S, Wellinger RJ. Budding yeast telomerase RNA transcription termination is dictated by the Nrd1/Nab3 non-coding RNA termination pathway. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(12):5625-36.
93. Hass EP, Zappulla DC. Repositioning the Sm-Binding Site in *Saccharomyces cerevisiae* Telomerase RNA Reveals RNP Organizational Flexibility and Sm-Directed 3'-End Formation. *Noncoding RNA.* 2020;6(1).

94. Zappulla DC, Goodrich K, Cech TR. A miniature yeast telomerase RNA functions in vivo and reconstitutes activity in vitro. *Nat Struct Mol Biol.* 2005;12(12):1072-7.
95. Laterreur N, Lemieux B, Neumann H, Berger-Dancause JC, Lafontaine D, Wellinger RJ. The yeast telomerase module for telomere recruitment requires a specific RNA architecture. *RNA.* 2018;24(8):1067-79.
96. Dandjinou AT, Levesque N, Larose S, Lucier JF, Abou Elela S, Wellinger RJ. A phylogenetically based secondary structure for the yeast telomerase RNA. *Curr Biol.* 2004;14(13):1148-58.
97. Livengood AJ, Zaug AJ, Cech TR. Essential regions of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase RNA: separate elements for Est1p and Est2p interaction. *Mol Cell Biol.* 2002;22(7):2366-74.
98. Lin J, Ly H, Hussain A, Abraham M, Pearl S, Tzfati Y, et al. A universal telomerase RNA core structure includes structured motifs required for binding the telomerase reverse transcriptase protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(41):14713-8.
99. Zappulla DC, Cech TR. Yeast telomerase RNA: a flexible scaffold for protein subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(27):10024-9.
100. Brown Y, Abraham M, Pearl S, Kabaha MM, Elboher E, Tzfati Y. A critical three-way junction is conserved in budding yeast and vertebrate telomerase RNAs. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(18):6280-9.
101. Peterson SE, Stellwagen AE, Diede SJ, Singer MS, Haimberger ZW, Johnson CO, et al. The function of a stem-loop in telomerase RNA is linked to the DNA repair protein Ku. *Nat Genet.* 2001;27(1):64-7.
102. Seto AG, Livengood AJ, Tzfati Y, Blackburn EH, Cech TR. A bulged stem tethers Est1p to telomerase RNA in budding yeast. *Genes Dev.* 2002;16(21):2800-12.
103. Laterreur N, Eschbach SH, Lafontaine DA, Wellinger RJ. A new telomerase RNA element that is critical for telomere elongation. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(16):7713-24.
104. Taggart AK, Teng SC, Zakian VA. Est1p as a cell cycle-regulated activator of telomere-bound telomerase. *Science.* 2002;297(5583):1023-6.

105. Tucey TM, Lundblad V. Regulated assembly and disassembly of the yeast telomerase quaternary complex. *Genes Dev.* 2014;28(19):2077-89.
106. Hughes TR, Evans SK, Weilbaecher RG, Lundblad V. The Est3 protein is a subunit of yeast telomerase. *Curr Biol.* 2000;10(13):809-12.
107. Esakova O, Krasilnikov AS. Of proteins and RNA: the RNase P/MRP family. *RNA.* 2010;16(9):1725-47.
108. Fagerlund RD, Perederina A, Berezin I, Krasilnikov AS. Footprinting analysis of interactions between the largest eukaryotic RNase P/MRP protein Pop1 and RNase P/MRP RNA components. *RNA.* 2015;21(9):1591-605.
109. Garcia PD, Leach RW, Wadsworth GM, Choudhary K, Li H, Aviran S, et al. Stability and nuclear localization of yeast telomerase depend on protein components of RNase P/MRP. *Nat Commun.* 2020;11(1):2173.
110. Wellinger RJ, Wolf AJ, Zakian VA. *Saccharomyces* telomeres acquire single-strand TG1-3 tails late in S phase. *Cell.* 1993;72(1):51-60.
111. Bonetti D, Martina M, Clerici M, Lucchini G, Longhese MP. Multiple pathways regulate 3' overhang generation at *S. cerevisiae* telomeres. *Mol Cell.* 2009;35(1):70-81.
112. Casari E, Rinaldi C, Marsella A, Gnugnoli M, Colombo CV, Bonetti D, et al. Processing of DNA Double-Strand Breaks by the MRX Complex in a Chromatin Context. *Front Mol Biosci.* 2019;6:43.
113. Villa M, Cassani C, Gobbin E, Bonetti D, Longhese MP. Coupling end resection with the checkpoint response at DNA double-strand breaks. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(19):3655-63.
114. Syed A, Tainer JA. The MRE11-RAD50-NBS1 Complex Conducts the Orchestration of Damage Signaling and Outcomes to Stress in DNA Replication and Repair. *Annu Rev Biochem.* 2018;87:263-94.
115. Cannavo E, Cejka P. Sae2 promotes dsDNA endonuclease activity within Mre11-Rad50-Xrs2 to resect DNA breaks. *Nature.* 2014;514(7520):122-5.
116. Reginato G, Cannavo E, Cejka P. Physiological protein blocks direct the Mre11-Rad50-Xrs2 and Sae2 nuclease complex to initiate DNA end resection. *Genes Dev.* 2017;31(23-24):2325-30.

117. Wang W, Daley JM, Kwon Y, Krasner DS, Sung P. Plasticity of the Mre11-Rad50-Xrs2-Sae2 nuclease ensemble in the processing of DNA-bound obstacles. *Genes Dev.* 2017;31(23-24):2331-6.
118. Hopfner KP, Craig L, Moncalian G, Zinkel RA, Usui T, Owen BA, et al. The Rad50 zinc-hook is a structure joining Mre11 complexes in DNA recombination and repair. *Nature.* 2002;418(6897):562-6.
119. He J, Shi LZ, Truong LN, Lu CS, Razavian N, Li Y, et al. Rad50 zinc hook is important for the Mre11 complex to bind chromosomal DNA double-stranded breaks and initiate various DNA damage responses. *J Biol Chem.* 2012;287(38):31747-56.
120. Deshpande RA, Williams GJ, Limbo O, Williams RS, Kuhnlein J, Lee JH, et al. ATP-driven Rad50 conformations regulate DNA tethering, end resection, and ATM checkpoint signaling. *EMBO J.* 2016;35(7):791.
121. Mockel C, Lammens K, Schele A, Hopfner KP. ATP driven structural changes of the bacterial Mre11:Rad50 catalytic head complex. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(2):914-27.
122. Liu Y, Sung S, Kim Y, Li F, Gwon G, Jo A, et al. ATP-dependent DNA binding, unwinding, and resection by the Mre11/Rad50 complex. *EMBO J.* 2016;35(7):743-58.
123. Tsukamoto Y, Mitsuoka C, Terasawa M, Ogawa H, Ogawa T. Xrs2p regulates Mre11p translocation to the nucleus and plays a role in telomere elongation and meiotic recombination. *Mol Biol Cell.* 2005;16(2):597-608.
124. Oh J, Al-Zain A, Cannavo E, Cejka P, Symington LS. Xrs2 Dependent and Independent Functions of the Mre11-Rad50 Complex. *Mol Cell.* 2016;64(2):405-15.
125. Ritchie KB, Petes TD. The Mre11p/Rad50p/Xrs2p complex and the Tel1p function in a single pathway for telomere maintenance in yeast. *Genetics.* 2000;155(1):475-9.
126. Faure V, Coulon S, Hardy J, Geli V. Cdc13 and telomerase bind through different mechanisms at the lagging- and leading-strand telomeres. *Mol Cell.* 2010;38(6):842-52.
127. Lustig AJ, Petes TD. Identification of yeast mutants with altered telomere structure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83(5):1398-402.

128. Greenwell PW, Kronmal SL, Porter SE, Gassenhuber J, Obermaier B, Petes TD. TEL1, a gene involved in controlling telomere length in *S. cerevisiae*, is homologous to the human ataxia telangiectasia gene. *Cell*. 1995;82(5):823-9.
129. Morrow DM, Tagle DA, Shiloh Y, Collins FS, Hieter P. TEL1, an *S. cerevisiae* homolog of the human gene mutated in ataxia telangiectasia, is functionally related to the yeast checkpoint gene MEC1. *Cell*. 1995;82(5):831-40.
130. Mallory JC, Petes TD. Protein kinase activity of Tel1p and Mec1p, two *Saccharomyces cerevisiae* proteins related to the human ATM protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(25):13749-54.
131. Tseng SF, Lin JJ, Teng SC. The telomerase-recruitment domain of the telomere binding protein Cdc13 is regulated by Mec1p/Tel1p-dependent phosphorylation. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(21):6327-36.
132. Gao H, Toro TB, Paschini M, Braunstein-Ballew B, Cervantes RB, Lundblad V. Telomerase recruitment in *Saccharomyces cerevisiae* is not dependent on Tel1-mediated phosphorylation of Cdc13. *Genetics*. 2010;186(4):1147-59.
133. Li S, Makovets S, Matsuguchi T, Blethrow JD, Shokat KM, Blackburn EH. Cdk1-dependent phosphorylation of Cdc13 coordinates telomere elongation during cell-cycle progression. *Cell*. 2009;136(1):50-61.
134. Hang LE, Liu X, Cheung I, Yang Y, Zhao X. SUMOylation regulates telomere length homeostasis by targeting Cdc13. *Nat Struct Mol Biol*. 2011;18(8):920-6.
135. Tucey TM, Lundblad V. A yeast telomerase complex containing the Est1 recruitment protein is assembled early in the cell cycle. *Biochemistry*. 2013;52(7):1131-3.
136. Gallardo F, Laterreur N, Cusanelli E, Ouenzar F, Querido E, Wellinger RJ, et al. Live cell imaging of telomerase RNA dynamics reveals cell cycle-dependent clustering of telomerase at elongating telomeres. *Mol Cell*. 2011;44(5):819-27.
137. Teixeira MT, Arneric M, Sperisen P, Lingner J. Telomere length homeostasis is achieved via a switch between telomerase- extendible and -nonextendible states. *Cell*. 2004;117(3):323-35.

138. McGee JS, Phillips JA, Chan A, Sabourin M, Paeschke K, Zakian VA. Reduced Rif2 and lack of Mec1 target short telomeres for elongation rather than double-strand break repair. *Nat Struct Mol Biol.* 2010;17(12):1438-45.
139. Hector RE, Shtofman RL, Ray A, Chen BR, Nyun T, Berkner KL, et al. Tel1p preferentially associates with short telomeres to stimulate their elongation. *Mol Cell.* 2007;27(5):851-8.
140. Sabourin M, Tuzon CT, Zakian VA. Telomerase and Tel1p preferentially associate with short telomeres in *S. cerevisiae*. *Mol Cell.* 2007;27(4):550-61.
141. Gotta M, Laroche T, Formenton A, Maillet L, Scherthan H, Gasser SM. The clustering of telomeres and colocalization with Rap1, Sir3, and Sir4 proteins in wild-type *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol.* 1996;134(6):1349-63.
142. Therizols P, Duong T, Dujon B, Zimmer C, Fabre E. Chromosome arm length and nuclear constraints determine the dynamic relationship of yeast subtelomeres. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(5):2025-30.
143. Jin QW, Fuchs J, Loidl J. Centromere clustering is a major determinant of yeast interphase nuclear organization. *J Cell Sci.* 2000;113 (Pt 11):1903-12.
144. Schober H, Kalck V, Vega-Palas MA, Van Houwe G, Sage D, Unser M, et al. Controlled exchange of chromosomal arms reveals principles driving telomere interactions in yeast. *Genome Res.* 2008;18(2):261-71.
145. Heun P, Laroche T, Shimada K, Furrer P, Gasser SM. Chromosome dynamics in the yeast interphase nucleus. *Science.* 2001;294(5549):2181-6.
146. Toulouze M, Amitai A, Shukron O, Holcman D, Dubrana K. Telomeric chromosome ends are highly mobile and behave like free double-strand DNA breaks. *bioRxiv.* 2019.
147. Tham WH, Wyithe JS, Ko Ferrigno P, Silver PA, Zakian VA. Localization of yeast telomeres to the nuclear periphery is separable from transcriptional repression and telomere stability functions. *Mol Cell.* 2001;8(1):189-99.
148. Hediger F, Neumann FR, Van Houwe G, Dubrana K, Gasser SM. Live imaging of telomeres: yKu and Sir proteins define redundant telomere-anchoring pathways in yeast. *Curr Biol.* 2002;12(24):2076-89.

149. Andrulis ED, Zappulla DC, Ansari A, Perrod S, Laiosa CV, Gartenberg MR, et al. Esc1, a nuclear periphery protein required for Sir4-based plasmid anchoring and partitioning. *Mol Cell Biol.* 2002;22(23):8292-301.
150. Palladino F, Laroche T, Gilson E, Axelrod A, Pillus L, Gasser SM. SIR3 and SIR4 proteins are required for the positioning and integrity of yeast telomeres. *Cell.* 1993;75(3):543-55.
151. Tzur YB, Wilson KL, Gruenbaum Y. SUN-domain proteins: 'Velcro' that links the nucleoskeleton to the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(10):782-8.
152. Sosa Ponce ML, Moradi-Fard S, Zaremborg V, Cobb JA. SUNny Ways: The Role of the SUN-Domain Protein Mps3 Bridging Yeast Nuclear Organization and Lipid Homeostasis. *Front Genet.* 2020;11:136.
153. Antoniaci LM, Kenna MA, Skibbens RV. The nuclear envelope and spindle pole body-associated Mps3 protein bind telomere regulators and function in telomere clustering. *Cell Cycle.* 2007;6(1):75-9.
154. Schober H, Ferreira H, Kalck V, Gehlen LR, Gasser SM. Yeast telomerase and the SUN domain protein Mps3 anchor telomeres and repress subtelomeric recombination. *Genes Dev.* 2009;23(8):928-38.
155. Aguilera P, Whalen J, Minguet C, Churikov D, Freudenreich C, Simon MN, et al. The nuclear pore complex prevents sister chromatid recombination during replicative senescence. *Nat Commun.* 2020;11(1):160.
156. Azzalin CM, Reichenbach P, Khoriantseva L, Giulotto E, Lingner J. Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends. *Science.* 2007;318(5851):798-801.
157. Schoeftner S, Blasco MA. Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II. *Nat Cell Biol.* 2008;10(2):228-36.
158. Feuerhahn S, Iglesias N, Panza A, Porro A, Lingner J. TERRA biogenesis, turnover and implications for function. *FEBS Lett.* 2010;584(17):3812-8.
159. Luke B, Panza A, Redon S, Iglesias N, Li Z, Lingner J. The Rat1p 5' to 3' exonuclease degrades telomeric repeat-containing RNA and promotes telomere elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell.* 2008;32(4):465-77.

160. Pfeiffer V, Lingner J. TERRA promotes telomere shortening through exonuclease 1-mediated resection of chromosome ends. *PLoS Genet.* 2012;8(6):e1002747.
161. Diman A, Decottignies A. Genomic origin and nuclear localization of TERRA telomeric repeat-containing RNA: from Darkness to Dawn. *FEBS J.* 2018;285(8):1389-98.
162. Porro A, Feuerhahn S, Reichenbach P, Lingner J. Molecular dissection of telomeric repeat-containing RNA biogenesis unveils the presence of distinct and multiple regulatory pathways. *Mol Cell Biol.* 2010;30(20):4808-17.
163. Moravec M, Wischniewski H, Bah A, Hu Y, Liu N, Lafranchi L, et al. TERRA promotes telomerase-mediated telomere elongation in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO Rep.* 2016;17(7):999-1012.
164. Rodrigues J, Lydall D. Paf1 and Ctr9, core components of the PAF1 complex, maintain low levels of telomeric repeat containing RNA. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(2):621-34.
165. Graf M, Bonetti D, Lockhart A, Serhal K, Kellner V, Maicher A, et al. Telomere Length Determines TERRA and R-Loop Regulation through the Cell Cycle. *Cell.* 2017;170(1):72-85 e14.
166. Iglesias N, Redon S, Pfeiffer V, Dees M, Lingner J, Luke B. Subtelomeric repetitive elements determine TERRA regulation by Rap1/Rif and Rap1/Sir complexes in yeast. *EMBO Rep.* 2011;12(6):587-93.
167. LaCava J, Houseley J, Saveanu C, Petfalski E, Thompson E, Jacquier A, et al. RNA degradation by the exosome is promoted by a nuclear polyadenylation complex. *Cell.* 2005;121(5):713-24.
168. Cusanelli E, Romero CA, Chartrand P. Telomeric noncoding RNA TERRA is induced by telomere shortening to nucleate telomerase molecules at short telomeres. *Mol Cell.* 2013;51(6):780-91.
169. Redon S, Reichenbach P, Lingner J. The non-coding RNA TERRA is a natural ligand and direct inhibitor of human telomerase. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(17):5797-806.
170. Chu HP, Cifuentes-Rojas C, Kesner B, Aeby E, Lee HG, Wei C, et al. TERRA RNA Antagonizes ATRX and Protects Telomeres. *Cell.* 2017;170(1):86-101 e16.

171. Ng LJ, Cropley JE, Pickett HA, Reddel RR, Suter CM. Telomerase activity is associated with an increase in DNA methylation at the proximal subtelomere and a reduction in telomeric transcription. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(4):1152-9.
172. Deng Z, Wang Z, Xiang C, Molczan A, Baubet V, Conejo-Garcia J, et al. Formation of telomeric repeat-containing RNA (TERRA) foci in highly proliferating mouse cerebellar neuronal progenitors and medulloblastoma. *J Cell Sci.* 2012;125(Pt 18):4383-94.
173. Kreilmeier T, Mejri D, Hauck M, Kleiter M, Holzmann K. Telomere Transcripts Target Telomerase in Human Cancer Cells. *Genes (Basel).* 2016;7(8).
174. Farnung BO, Brun CM, Arora R, Lorenzi LE, Azzalin CM. Telomerase efficiently elongates highly transcribing telomeres in human cancer cells. *PLoS One.* 2012;7(4):e35714.
175. Sagie S, Ellran E, Katzir H, Shaked R, Yehezkel S, Laevsky I, et al. Induced pluripotent stem cells as a model for telomeric abnormalities in ICF type I syndrome. *Hum Mol Genet.* 2014;23(14):3629-40.
176. Lalonde M, Chartrand P. TERRA, a Multifaceted Regulator of Telomerase Activity at Telomeres. *J Mol Biol.* 2020.
177. Sandell LL, Gottschling DE, Zakian VA. Transcription of a yeast telomere alleviates telomere position effect without affecting chromosome stability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(25):12061-5.
178. Maicher A, Kastner L, Dees M, Luke B. Deregulated telomere transcription causes replication-dependent telomere shortening and promotes cellular senescence. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(14):6649-59.
179. Guerit D, Lalonde M, Chartrand P. Telomerase RNA Imaging in Budding Yeast and Human Cells by Fluorescent In Situ Hybridization. *Methods Mol Biol.* 2018;1672:387-402.
180. Laprade H, Lalonde M, Guerit D, Chartrand P. Live-cell imaging of budding yeast telomerase RNA and TERRA. *Methods.* 2017;114:46-53.
181. Ranjha L, Howard SM, Cejka P. Main steps in DNA double-strand break repair: an introduction to homologous recombination and related processes. *Chromosoma.* 2018;127(2):187-214.

182. Hanawalt P, Sweasy J. Mechanistic understanding of cellular responses to genomic stress. *Environ Mol Mutagen*. 2020;61(1):25-33.
183. Ciccia A, Elledge SJ. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell*. 2010;40(2):179-204.
184. Malacaria E, Honda M, Franchitto A, Spies M, Pichierri P. Physiological and Pathological Roles of RAD52 at DNA Replication Forks. *Cancers (Basel)*. 2020;12(2).
185. Campos A, Clemente-Blanco A. Cell Cycle and DNA Repair Regulation in the Damage Response: Protein Phosphatases Take Over the Reins. *Int J Mol Sci*. 2020;21(2).
186. Prakash S, Prakash L. Nucleotide excision repair in yeast. *Mutat Res*. 2000;451(1-2):13-24.
187. Shuck SC, Short EA, Turchi JJ. Eukaryotic nucleotide excision repair: from understanding mechanisms to influencing biology. *Cell Res*. 2008;18(1):64-72.
188. Shah P, He YY. Molecular regulation of UV-induced DNA repair. *Photochem Photobiol*. 2015;91(2):254-64.
189. Scharer OD. Nucleotide excision repair in eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(10):a012609.
190. Souliotis VL, Vlachogiannis NI, Pappa M, Argyriou A, Ntouros PA, Sfikakis PP. DNA Damage Response and Oxidative Stress in Systemic Autoimmunity. *Int J Mol Sci*. 2019;21(1).
191. Li S. Transcription coupled nucleotide excision repair in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: The ambiguous role of Rad26. *DNA Repair (Amst)*. 2015;36:43-8.
192. Tatum DL, S. Nucleotide Excision Repair in *S. cerevisiae*. In: Storici F, editor. *DNA Repair - On the Pathways to Fixing DNA Damage and Errors*: IntechOpen; September 9th 2011.
193. Krokan HE, Bjoras M. Base excision repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(4):a012583.
194. Memisoglu A, Samson L. Base excision repair in yeast and mammals. *Mutat Res*. 2000;451(1-2):39-51.
195. Jacobs AL, Schar P. DNA glycosylases: in DNA repair and beyond. *Chromosoma*. 2012;121(1):1-20.

196. Jiricny J. The multifaceted mismatch-repair system. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(5):335-46.
197. Li GM. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res.* 2008;18(1):85-98.
198. Kaina B, Christmann M, Naumann S, Roos WP. MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA Repair (Amst).* 2007;6(8):1079-99.
199. Ira G, Pellicioli A, Balijja A, Wang X, Fiorani S, Carotenuto W, et al. DNA end resection, homologous recombination and DNA damage checkpoint activation require CDK1. *Nature.* 2004;431(7011):1011-7.
200. Clerici M, Mantiero D, Guerini I, Lucchini G, Longhese MP. The Yku70-Yku80 complex contributes to regulate double-strand break processing and checkpoint activation during the cell cycle. *EMBO Rep.* 2008;9(8):810-8.
201. Huertas P, Cortes-Ledesma F, Sartori AA, Aguilera A, Jackson SP. CDK targets Sae2 to control DNA-end resection and homologous recombination. *Nature.* 2008;455(7213):689-92.
202. Olive PL, Banath JP, Durand RE. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiat Res.* 1990;122(1):86-94.
203. Staaf E, Brehwens K, Haghdoust S, Czub J, Wojcik A. Gamma-H2AX foci in cells exposed to a mixed beam of X-rays and alpha particles. *Genome Integr.* 2012;3(1):8.
204. Pinto M, Prise KM, Michael BD. Evidence for complexity at the nanometer scale of radiation-induced DNA DSBs as a determinant of rejoining kinetics. *Radiat Res.* 2005;164(1):73-85.
205. Walker JR, Corpina RA, Goldberg J. Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature.* 2001;412(6847):607-14.
206. Daley JM, Palmboos PL, Wu D, Wilson TE. Nonhomologous end joining in yeast. *Annu Rev Genet.* 2005;39:431-51.
207. Dudasova Z, Dudas A, Chovanec M. Non-homologous end-joining factors of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev.* 2004;28(5):581-601.

208. Pannunzio NR, Li S, Watanabe G, Lieber MR. Non-homologous end joining often uses microhomology: implications for alternative end joining. *DNA Repair (Amst)*. 2014;17:74-80.
209. Sfeir A, Symington LS. Microhomology-Mediated End Joining: A Back-up Survival Mechanism or Dedicated Pathway? *Trends Biochem Sci*. 2015;40(11):701-14.
210. Wang H, Xu X. Microhomology-mediated end joining: new players join the team. *Cell Biosci*. 2017;7:6.
211. Truong LN, Li Y, Shi LZ, Hwang PY, He J, Wang H, et al. Microhomology-mediated End Joining and Homologous Recombination share the initial end resection step to repair DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(19):7720-5.
212. Deng SK, Gibb B, de Almeida MJ, Greene EC, Symington LS. RPA antagonizes microhomology-mediated repair of DNA double-strand breaks. *Nat Struct Mol Biol*. 2014;21(4):405-12.
213. Meyer D, Fu BX, Heyer WD. DNA polymerases delta and lambda cooperate in repairing double-strand breaks by microhomology-mediated end-joining in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(50):E6907-16.
214. Ahmad A, Robinson AR, Duensing A, van Drunen E, Beverloo HB, Weisberg DB, et al. ERCC1-XPF endonuclease facilitates DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol*. 2008;28(16):5082-92.
215. Kelley MR, Fishel ML. Overview of DNA repair pathways, current targets, and clinical trials bench to clinic. In: Kelley MR, Fishel ML, editors. *DNA Repair in Cancer Therapy*. Second Edition ed: Academic Press; 2016. p. Pages 1-54.
216. Zhu Z, Chung WH, Shim EY, Lee SE, Ira G. Sgs1 helicase and two nucleases Dna2 and Exo1 resect DNA double-strand break ends. *Cell*. 2008;134(6):981-94.
217. Paull TT, Gellert M. The 3' to 5' exonuclease activity of Mre 11 facilitates repair of DNA double-strand breaks. *Mol Cell*. 1998;1(7):969-79.
218. Sartori AA, Lukas C, Coates J, Mistrik M, Fu S, Bartek J, et al. Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature*. 2007;450(7169):509-14.

219. Cejka P, Cannavo E, Polaczek P, Masuda-Sasa T, Pokharel S, Campbell JL, et al. DNA end resection by Dna2-Sgs1-RPA and its stimulation by Top3-Rmi1 and Mre11-Rad50-Xrs2. *Nature*. 2010;467(7311):112-6.
220. Wold MS. Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annu Rev Biochem*. 1997;66:61-92.
221. Broderick S, Rehmet K, Concannon C, Nasheuer HP. Eukaryotic single-stranded DNA binding proteins: central factors in genome stability. *Subcell Biochem*. 2010;50:143-63.
222. Choi JH, Lindsey-Boltz LA, Kemp M, Mason AC, Wold MS, Sancar A. Reconstitution of RPA-covered single-stranded DNA-activated ATR-Chk1 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(31):13660-5.
223. Marechal A, Li JM, Ji XY, Wu CS, Yazinski SA, Nguyen HD, et al. PRP19 transforms into a sensor of RPA-ssDNA after DNA damage and drives ATR activation via a ubiquitin-mediated circuitry. *Mol Cell*. 2014;53(2):235-46.
224. Heyer WD, Ehmsen KT, Liu J. Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annu Rev Genet*. 2010;44:113-39.
225. Song B, Sung P. Functional interactions among yeast Rad51 recombinase, Rad52 mediator, and replication protein A in DNA strand exchange. *J Biol Chem*. 2000;275(21):15895-904.
226. Sung P. Function of yeast Rad52 protein as a mediator between replication protein A and the Rad51 recombinase. *J Biol Chem*. 1997;272(45):28194-7.
227. Mortensen UH, Bendixen C, Sunjevaric I, Rothstein R. DNA strand annealing is promoted by the yeast Rad52 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(20):10729-34.
228. Gibb B, Ye LF, Kwon Y, Niu H, Sung P, Greene EC. Protein dynamics during presynaptic-complex assembly on individual single-stranded DNA molecules. *Nat Struct Mol Biol*. 2014;21(10):893-900.
229. Gibb B, Ye LF, Gergoudis SC, Kwon Y, Niu H, Sung P, et al. Concentration-dependent exchange of replication protein A on single-stranded DNA revealed by single-molecule imaging. *PLoS One*. 2014;9(2):e87922.

230. Dion V, Kalck V, Horigome C, Towbin BD, Gasser SM. Increased mobility of double-strand breaks requires Mec1, Rad9 and the homologous recombination machinery. *Nat Cell Biol.* 2012;14(5):502-9.
231. Dion V, Kalck V, Seeber A, Schleker T, Gasser SM. Cohesin and the nucleolus constrain the mobility of spontaneous repair foci. *EMBO Rep.* 2013;14(11):984-91.
232. Oza P, Jaspersen SL, Miele A, Dekker J, Peterson CL. Mechanisms that regulate localization of a DNA double-strand break to the nuclear periphery. *Genes Dev.* 2009;23(8):912-27.
233. Horigome C, Oma Y, Konishi T, Schmid R, Marcomini I, Hauer MH, et al. SWR1 and INO80 chromatin remodelers contribute to DNA double-strand break perinuclear anchorage site choice. *Mol Cell.* 2014;55(4):626-39.
234. Sung P. Catalysis of ATP-dependent homologous DNA pairing and strand exchange by yeast RAD51 protein. *Science.* 1994;265(5176):1241-3.
235. Sung P. Yeast Rad55 and Rad57 proteins form a heterodimer that functions with replication protein A to promote DNA strand exchange by Rad51 recombinase. *Genes Dev.* 1997;11(9):1111-21.
236. Petukhova G, Stratton S, Sung P. Catalysis of homologous DNA pairing by yeast Rad51 and Rad54 proteins. *Nature.* 1998;393(6680):91-4.
237. Alexeev A, Mazin A, Kowalczykowski SC. Rad54 protein possesses chromatin-remodeling activity stimulated by the Rad51-ssDNA nucleoprotein filament. *Nat Struct Biol.* 2003;10(3):182-6.
238. Alexiadis V, Kadonaga JT. Strand pairing by Rad54 and Rad51 is enhanced by chromatin. *Genes Dev.* 2002;16(21):2767-71.
239. Krejci L, Van Komen S, Li Y, Villemain J, Reddy MS, Klein H, et al. DNA helicase Srs2 disrupts the Rad51 presynaptic filament. *Nature.* 2003;423(6937):305-9.
240. Veaute X, Jeusset J, Soustelle C, Kowalczykowski SC, Le Cam E, Fabre F. The Srs2 helicase prevents recombination by disrupting Rad51 nucleoprotein filaments. *Nature.* 2003;423(6937):309-12.

241. Nimonkar AV, Sica RA, Kowalczykowski SC. Rad52 promotes second-end DNA capture in double-stranded break repair to form complement-stabilized joint molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(9):3077-82.
242. Duckett DR, Murchie AI, Diekmann S, von Kitzing E, Kemper B, Lilley DM. The structure of the Holliday junction, and its resolution. *Cell*. 1988;55(1):79-89.
243. Wechsler T, Newman S, West SC. Aberrant chromosome morphology in human cells defective for Holliday junction resolution. *Nature*. 2011;471(7340):642-6.
244. Mathiasen DP, Lisby M. Cell cycle regulation of homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev*. 2014;38(2):172-84.
245. Matsuoka S, Ballif BA, Smogorzewska A, McDonald ER, 3rd, Hurov KE, Luo J, et al. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science*. 2007;316(5828):1160-6.
246. Bennetzen MV, Larsen DH, Bunkenborg J, Bartek J, Lukas J, Andersen JS. Site-specific phosphorylation dynamics of the nuclear proteome during the DNA damage response. *Mol Cell Proteomics*. 2010;9(6):1314-23.
247. Lazzaro F, Giannattasio M, Puddu F, Granata M, Pellicoli A, Plevani P, et al. Checkpoint mechanisms at the intersection between DNA damage and repair. *DNA Repair (Amst)*. 2009;8(9):1055-67.
248. Adams KE, Medhurst AL, Dart DA, Lakin ND. Recruitment of ATR to sites of ionising radiation-induced DNA damage requires ATM and components of the MRN protein complex. *Oncogene*. 2006;25(28):3894-904.
249. Cimprich KA, Cortez D. ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(8):616-27.
250. Paciotti V, Clerici M, Lucchini G, Longhese MP. The checkpoint protein Ddc2, functionally related to *S. pombe* Rad26, interacts with Mec1 and is regulated by Mec1-dependent phosphorylation in budding yeast. *Genes Dev*. 2000;14(16):2046-59.
251. Zou L, Elledge SJ. Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science*. 2003;300(5625):1542-8.

252. Aylon Y, Kupiec M. The checkpoint protein Rad24 of *Saccharomyces cerevisiae* is involved in processing double-strand break ends and in recombination partner choice. *Mol Cell Biol.* 2003;23(18):6585-96.
253. Lowndes NF, Murguia JR. Sensing and responding to DNA damage. *Curr Opin Genet Dev.* 2000;10(1):17-25.
254. Ellison V, Stillman B. Biochemical characterization of DNA damage checkpoint complexes: clamp loader and clamp complexes with specificity for 5' recessed DNA. *PLoS Biol.* 2003;1(2):E33.
255. Clerici M, Trovesi C, Galbiati A, Lucchini G, Longhese MP. Mec1/ATR regulates the generation of single-stranded DNA that attenuates Tel1/ATM signaling at DNA ends. *EMBO J.* 2014;33(3):198-216.
256. Cassani C, Gobbini E, Wang W, Niu H, Clerici M, Sung P, et al. Tel1 and Rif2 Regulate MRX Functions in End-Tethering and Repair of DNA Double-Strand Breaks. *PLoS Biol.* 2016;14(2):e1002387.
257. Lee K, Zhang Y, Lee SE. *Saccharomyces cerevisiae* ATM orthologue suppresses break-induced chromosome translocations. *Nature.* 2008;454(7203):543-6.
258. Downs JA, Lowndes NF, Jackson SP. A role for *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A in DNA repair. *Nature.* 2000;408(6815):1001-4.
259. Stucki M, Clapperton JA, Mohammad D, Yaffe MB, Smerdon SJ, Jackson SP. MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell.* 2005;123(7):1213-26.
260. Hammet A, Magill C, Heierhorst J, Jackson SP. Rad9 BRCT domain interaction with phosphorylated H2AX regulates the G1 checkpoint in budding yeast. *EMBO Rep.* 2007;8(9):851-7.
261. Bonetti D, Villa M, Gobbini E, Cassani C, Tedeschi G, Longhese MP. Escape of Sgs1 from Rad9 inhibition reduces the requirement for Sae2 and functional MRX in DNA end resection. *EMBO Rep.* 2015;16(3):351-61.

262. Ferrari M, Dibitetto D, De Gregorio G, Eapen VV, Rawal CC, Lazzaro F, et al. Functional interplay between the 53BP1-ortholog Rad9 and the Mre11 complex regulates resection, end-tethering and repair of a double-strand break. *PLoS Genet.* 2015;11(1):e1004928.
263. Smith J, Tho LM, Xu N, Gillespie DA. The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *Adv Cancer Res.* 2010;108:73-112.
264. Schwartz MF, Duong JK, Sun Z, Morrow JS, Pradhan D, Stern DF. Rad9 phosphorylation sites couple Rad53 to the *Saccharomyces cerevisiae* DNA damage checkpoint. *Mol Cell.* 2002;9(5):1055-65.
265. Sanchez Y, Desany BA, Jones WJ, Liu Q, Wang B, Elledge SJ. Regulation of RAD53 by the ATM-like kinases MEC1 and TEL1 in yeast cell cycle checkpoint pathways. *Science.* 1996;271(5247):357-60.
266. Jia X, Weinert T, Lydall D. Mec1 and Rad53 inhibit formation of single-stranded DNA at telomeres of *Saccharomyces cerevisiae* cdc13-1 mutants. *Genetics.* 2004;166(2):753-64.
267. Grenon M, Costelloe T, Jimeno S, O'Shaughnessy A, Fitzgerald J, Zgheib O, et al. Docking onto chromatin via the *Saccharomyces cerevisiae* Rad9 Tudor domain. *Yeast.* 2007;24(2):105-19.
268. Dantuma NP, van Attikum H. Spatiotemporal regulation of posttranslational modifications in the DNA damage response. *EMBO J.* 2016;35(1):6-23.
269. Scheffner M, Nuber U, Huibregtse JM. Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature.* 1995;373(6509):81-3.
270. Komander D, Rape M. The ubiquitin code. *Annu Rev Biochem.* 2012;81:203-29.
271. Lindroos HB, Strom L, Itoh T, Katou Y, Shirahige K, Sjogren C. Chromosomal association of the Smc5/6 complex reveals that it functions in differently regulated pathways. *Mol Cell.* 2006;22(6):755-67.
272. Johnson ES, Gupta AA. An E3-like factor that promotes SUMO conjugation to the yeast septins. *Cell.* 2001;106(6):735-44.
273. Hay RT. Decoding the SUMO signal. *Biochem Soc Trans.* 2013;41(2):463-73.
274. Psakhye I, Jentsch S. Protein group modification and synergy in the SUMO pathway as exemplified in DNA repair. *Cell.* 2012;151(4):807-20.

275. Praefcke GJ, Hofmann K, Dohmen RJ. SUMO playing tag with ubiquitin. *Trends Biochem Sci.* 2012;37(1):23-31.
276. Sriramachandran AM, Dohmen RJ. SUMO-targeted ubiquitin ligases. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1843(1):75-85.
277. Silver HR, Nissley JA, Reed SH, Hou YM, Johnson ES. A role for SUMO in nucleotide excision repair. *DNA Repair (Amst).* 2011;10(12):1243-51.
278. Griffiths LM, Swartzlander D, Meadows KL, Wilkinson KD, Corbett AH, Doetsch PW. Dynamic compartmentalization of base excision repair proteins in response to nuclear and mitochondrial oxidative stress. *Mol Cell Biol.* 2009;29(3):794-807.
279. Parker JL, Ulrich HD. A SUMO-interacting motif activates budding yeast ubiquitin ligase Rad18 towards SUMO-modified PCNA. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(22):11380-8.
280. Hang LE, Lopez CR, Liu X, Williams JM, Chung I, Wei L, et al. Regulation of Ku-DNA association by Yku70 C-terminal tail and SUMO modification. *J Biol Chem.* 2014;289(15):10308-17.
281. Vidasova D, Sarangi P, Kolesar P, Vlasakova D, Slezakova Z, Altmannova V, et al. Lif1 SUMOylation and its role in non-homologous end-joining. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(10):5341-53.
282. Jalal D, Chalissery J, Hassan AH. Genome maintenance in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of SUMO and SUMO-targeted ubiquitin ligases. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(5):2242-61.
283. Cremona CA, Sarangi P, Yang Y, Hang LE, Rahman S, Zhao X. Extensive DNA damage-induced sumoylation contributes to replication and repair and acts in addition to the mec1 checkpoint. *Mol Cell.* 2012;45(3):422-32.
284. Sacher M, Pfander B, Hoege C, Jentsch S. Control of Rad52 recombination activity by double-strand break-induced SUMO modification. *Nat Cell Biol.* 2006;8(11):1284-90.
285. Altmannova V, Eckert-Boulet N, Arneric M, Kolesar P, Chaloupkova R, Damborsky J, et al. Rad52 SUMOylation affects the efficiency of the DNA repair. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(14):4708-21.

286. Bergink S, Ammon T, Kern M, Schermelleh L, Leonhardt H, Jentsch S. Role of Cdc48/p97 as a SUMO-targeted segregase curbing Rad51-Rad52 interaction. *Nat Cell Biol.* 2013;15(5):526-32.
287. Xie Y, Kerscher O, Kroetz MB, McConchie HF, Sung P, Hochstrasser M. The yeast Hex3.Slx8 heterodimer is a ubiquitin ligase stimulated by substrate sumoylation. *J Biol Chem.* 2007;282(47):34176-84.
288. Burgess RC, Rahman S, Lisby M, Rothstein R, Zhao X. The Slx5-Slx8 complex affects sumoylation of DNA repair proteins and negatively regulates recombination. *Mol Cell Biol.* 2007;27(17):6153-62.
289. Torres-Rosell J, Sunjevaric I, De Piccoli G, Sacher M, Eckert-Boulet N, Reid R, et al. The Smc5-Smc6 complex and SUMO modification of Rad52 regulates recombinational repair at the ribosomal gene locus. *Nat Cell Biol.* 2007;9(8):923-31.
290. Korsholm LM, Gal Z, Lin L, Quevedo O, Ahmad DA, Dulina E, et al. Double-strand breaks in ribosomal RNA genes activate a distinct signaling and chromatin response to facilitate nucleolar restructuring and repair. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(15):8019-35.
291. Horigome C, Bustard DE, Marcomini I, Delgosaie N, Tsai-Pflugfelder M, Cobb JA, et al. PolySUMOylation by Siz2 and Mms21 triggers relocation of DNA breaks to nuclear pores through the Slx5/Slx8 STUbL. *Genes Dev.* 2016;30(8):931-45.
292. Zhou Z, Elledge SJ. DUN1 encodes a protein kinase that controls the DNA damage response in yeast. *Cell.* 1993;75(6):1119-27.
293. Zhao X, Chabes A, Domkin V, Thelander L, Rothstein R. The ribonucleotide reductase inhibitor Sml1 is a new target of the Mec1/Rad53 kinase cascade during growth and in response to DNA damage. *EMBO J.* 2001;20(13):3544-53.
294. Sidorova JM, Breeden LL. Rad53-dependent phosphorylation of Swi6 and down-regulation of CLN1 and CLN2 transcription occur in response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 1997;11(22):3032-45.
295. Li X, Cai M. Inactivation of the cyclin-dependent kinase Cdc28 abrogates cell cycle arrest induced by DNA damage and disassembly of mitotic spindles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 1997;17(5):2723-34.

296. Cohen-Fix O, Koshland D. The anaphase inhibitor of *Saccharomyces cerevisiae* Pds1p is a target of the DNA damage checkpoint pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(26):14361-6.
297. Cohen-Fix O, Peters JM, Kirschner MW, Koshland D. Anaphase initiation in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by the APC-dependent degradation of the anaphase inhibitor Pds1p. *Genes Dev*. 1996;10(24):3081-93.
298. Yamamoto A, Guacci V, Koshland D. Pds1p, an inhibitor of anaphase in budding yeast, plays a critical role in the APC and checkpoint pathway(s). *J Cell Biol*. 1996;133(1):99-110.
299. Ciosk R, Zachariae W, Michaelis C, Shevchenko A, Mann M, Nasmyth K. An ESP1/PDS1 complex regulates loss of sister chromatid cohesion at the metaphase to anaphase transition in yeast. *Cell*. 1998;93(6):1067-76.
300. Moronta-Gines M, van Staveren TRH, Wendt KS. One ring to bind them - Cohesin's interaction with chromatin fibers. *Essays Biochem*. 2019;63(1):167-76.
301. Uhlmann F. SMC complexes: from DNA to chromosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016;17(7):399-412.
302. Skibbens RV. Condensins and cohesins - one of these things is not like the other! *J Cell Sci*. 2019;132(3).
303. Palecek JJ. SMC5/6: Multifunctional Player in Replication. *Genes (Basel)*. 2018;10(1).
304. Peters JM, Tedeschi A, Schmitz J. The cohesin complex and its roles in chromosome biology. *Genes Dev*. 2008;22(22):3089-114.
305. Murayama Y, Samora CP, Kurokawa Y, Iwasaki H, Uhlmann F. Establishment of DNA-DNA Interactions by the Cohesin Ring. *Cell*. 2018;172(3):465-77 e15.
306. Gruber S, Haering CH, Nasmyth K. Chromosomal cohesin forms a ring. *Cell*. 2003;112(6):765-77.
307. Huang CE, Milutinovich M, Koshland D. Rings, bracelet or snaps: fashionable alternatives for SMC complexes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2005;360(1455):537-42.
308. Li Y, Muir KW, Bowler MW, Metz J, Haering CH, Panne D. Structural basis for Scc3-dependent cohesin recruitment to chromatin. *Elife*. 2018;7.
309. Uhlmann F, Nasmyth K. Cohesion between sister chromatids must be established during DNA replication. *Curr Biol*. 1998;8(20):1095-101.

310. Gerlich D, Koch B, Dupeux F, Peters JM, Ellenberg J. Live-cell imaging reveals a stable cohesin-chromatin interaction after but not before DNA replication. *Curr Biol*. 2006;16(15):1571-8.
311. Furuya K, Takahashi K, Yanagida M. Faithful anaphase is ensured by Mis4, a sister chromatid cohesion molecule required in S phase and not destroyed in G1 phase. *Genes Dev*. 1998;12(21):3408-18.
312. Michaelis C, Ciosk R, Nasmyth K. Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids. *Cell*. 1997;91(1):35-45.
313. Chao WC, Murayama Y, Munoz S, Costa A, Uhlmann F, Singleton MR. Structural Studies Reveal the Functional Modularity of the Scc2-Scc4 Cohesin Loader. *Cell Rep*. 2015;12(5):719-25.
314. Murayama Y, Uhlmann F. Biochemical reconstitution of topological DNA binding by the cohesin ring. *Nature*. 2014;505(7483):367-71.
315. Ciosk R, Shirayama M, Shevchenko A, Tanaka T, Toth A, Shevchenko A, et al. Cohesin's binding to chromosomes depends on a separate complex consisting of Scc2 and Scc4 proteins. *Mol Cell*. 2000;5(2):243-54.
316. Blat Y, Kleckner N. Cohesins bind to preferential sites along yeast chromosome III, with differential regulation along arms versus the centric region. *Cell*. 1999;98(2):249-59.
317. Tanaka T, Cosma MP, Wirth K, Nasmyth K. Identification of cohesin association sites at centromeres and along chromosome arms. *Cell*. 1999;98(6):847-58.
318. Schmidt CK, Brookes N, Uhlmann F. Conserved features of cohesin binding along fission yeast chromosomes. *Genome Biol*. 2009;10(5):R52.
319. Glynn EF, Megee PC, Yu HG, Mistrot C, Unal E, Koshland DE, et al. Genome-wide mapping of the cohesin complex in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Biol*. 2004;2(9):E259.
320. Megee PC, Mistrot C, Guacci V, Koshland D. The centromeric sister chromatid cohesion site directs Mcd1p binding to adjacent sequences. *Mol Cell*. 1999;4(3):445-50.
321. Laloraya S, Guacci V, Koshland D. Chromosomal addresses of the cohesin component Mcd1p. *J Cell Biol*. 2000;151(5):1047-56.

322. Lengronne A, Katou Y, Mori S, Yokobayashi S, Kelly GP, Itoh T, et al. Cohesin relocation from sites of chromosomal loading to places of convergent transcription. *Nature*. 2004;430(6999):573-8.
323. Ocampo-Hafalla M, Munoz S, Samora CP, Uhlmann F. Evidence for cohesin sliding along budding yeast chromosomes. *Open Biol*. 2016;6(6).
324. Davidson IF, Goetz D, Zaczek MP, Molodtsov MI, Huis In 't Veld PJ, Weissmann F, et al. Rapid movement and transcriptional re-localization of human cohesin on DNA. *EMBO J*. 2016;35(24):2671-85.
325. Bausch C, Noone S, Henry JM, Gaudenz K, Sanderson B, Seidel C, et al. Transcription alters chromosomal locations of cohesin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 2007;27(24):8522-32.
326. Busslinger GA, Stocsits RR, van der Lelij P, Axelsson E, Tedeschi A, Galjart N, et al. Cohesin is positioned in mammalian genomes by transcription, CTCF and Wapl. *Nature*. 2017;544(7651):503-7.
327. Wendt KS, Yoshida K, Itoh T, Bando M, Koch B, Schirghuber E, et al. Cohesin mediates transcriptional insulation by CCCTC-binding factor. *Nature*. 2008;451(7180):796-801.
328. Zuin J, Dixon JR, van der Reijden MI, Ye Z, Kolovos P, Brouwer RW, et al. Cohesin and CTCF differentially affect chromatin architecture and gene expression in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(3):996-1001.
329. Nora EP, Goloborodko A, Valton AL, Gibcus JH, Uebersohn A, Abdennur N, et al. Targeted Degradation of CTCF Decouples Local Insulation of Chromosome Domains from Genomic Compartmentalization. *Cell*. 2017;169(5):930-44 e22.
330. Sofueva S, Yaffe E, Chan WC, Georgopoulou D, Vietri Rudan M, Mira-Bontenbal H, et al. Cohesin-mediated interactions organize chromosomal domain architecture. *EMBO J*. 2013;32(24):3119-29.
331. Alipour E, Marko JF. Self-organization of domain structures by DNA-loop-extruding enzymes. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(22):11202-12.

332. Gruber S, Arumugam P, Katou Y, Kuglitsch D, Helmhart W, Shirahige K, et al. Evidence that loading of cohesin onto chromosomes involves opening of its SMC hinge. *Cell*. 2006;127(3):523-37.
333. Srinivasan M, Scheinost JC, Petela NJ, Gligoris TG, Wissler M, Ogushi S, et al. The Cohesin Ring Uses Its Hinge to Organize DNA Using Non-topological as well as Topological Mechanisms. *Cell*. 2018;173(6):1508-19 e18.
334. Murayama Y, Uhlmann F. DNA Entry into and Exit out of the Cohesin Ring by an Interlocking Gate Mechanism. *Cell*. 2015;163(7):1628-40.
335. Weitzer S, Lehane C, Uhlmann F. A model for ATP hydrolysis-dependent binding of cohesin to DNA. *Curr Biol*. 2003;13(22):1930-40.
336. Camdere G, Guacci V, Stricklin J, Koshland D. The ATPases of cohesin interface with regulators to modulate cohesin-mediated DNA tethering. *Elife*. 2015;4.
337. Camdere GO, Carlborg KK, Koshland D. Intermediate step of cohesin's ATPase cycle allows cohesin to entrap DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(39):9732-7.
338. Minamino M, Higashi TL, Bouchoux C, Uhlmann F. Topological in vitro loading of the budding yeast cohesin ring onto DNA. *Life Sci Alliance*. 2018;1(5).
339. McIntyre J, Muller EG, Weitzer S, Snyderman BE, Davis TN, Uhlmann F. In vivo analysis of cohesin architecture using FRET in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*. 2007;26(16):3783-93.
340. Kueng S, Hegemann B, Peters BH, Lipp JJ, Schleiffer A, Mechtler K, et al. Wapl controls the dynamic association of cohesin with chromatin. *Cell*. 2006;127(5):955-67.
341. Sutani T, Kawaguchi T, Kanno R, Itoh T, Shirahige K. Budding yeast Wpl1(Rad61)-Pds5 complex counteracts sister chromatid cohesion-establishing reaction. *Curr Biol*. 2009;19(6):492-7.
342. Chatterjee A, Zakian S, Hu XW, Singleton MR. Structural insights into the regulation of cohesion establishment by Wpl1. *EMBO J*. 2013;32(5):677-87.
343. Lopez-Serra L, Lengronne A, Borges V, Kelly G, Uhlmann F. Budding yeast Wapl controls sister chromatid cohesion maintenance and chromosome condensation. *Curr Biol*. 2013;23(1):64-9.

344. Huber RG, Kulemzina I, Ang K, Chavda AP, Suranthran S, Teh JT, et al. Impairing Cohesin Smc1/3 Head Engagement Compensates for the Lack of Eco1 Function. *Structure*. 2016;24(11):1991-9.
345. Chan KL, Roig MB, Hu B, Beckouet F, Metson J, Nasmyth K. Cohesin's DNA exit gate is distinct from its entrance gate and is regulated by acetylation. *Cell*. 2012;150(5):961-74.
346. Rowland BD, Roig MB, Nishino T, Kurze A, Uluocak P, Mishra A, et al. Building sister chromatid cohesion: smc3 acetylation counteracts an antiestablishment activity. *Mol Cell*. 2009;33(6):763-74.
347. Skibbens RV, Corson LB, Koshland D, Hieter P. Ctf7p is essential for sister chromatid cohesion and links mitotic chromosome structure to the DNA replication machinery. *Genes Dev*. 1999;13(3):307-19.
348. Toth A, Ciosk R, Uhlmann F, Galova M, Schleiffer A, Nasmyth K. Yeast cohesin complex requires a conserved protein, Eco1p(Ctf7), to establish cohesion between sister chromatids during DNA replication. *Genes Dev*. 1999;13(3):320-33.
349. Ivanov D, Schleiffer A, Eisenhaber F, Mechtler K, Haering CH, Nasmyth K. Eco1 is a novel acetyltransferase that can acetylate proteins involved in cohesion. *Curr Biol*. 2002;12(4):323-8.
350. Zhang J, Shi X, Li Y, Kim BJ, Jia J, Huang Z, et al. Acetylation of Smc3 by Eco1 is required for S phase sister chromatid cohesion in both human and yeast. *Mol Cell*. 2008;31(1):143-51.
351. Kenna MA, Skibbens RV. Mechanical link between cohesion establishment and DNA replication: Ctf7p/Eco1p, a cohesion establishment factor, associates with three different replication factor C complexes. *Mol Cell Biol*. 2003;23(8):2999-3007.
352. Moldovan GL, Pfander B, Jentsch S. PCNA controls establishment of sister chromatid cohesion during S phase. *Mol Cell*. 2006;23(5):723-32.
353. Ghosh S, Gardner JM, Smoyer CJ, Friederichs JM, Unruh JR, Slaughter BD, et al. Acetylation of the SUN protein Mps3 by Eco1 regulates its function in nuclear organization. *Mol Biol Cell*. 2012;23(13):2546-59.
354. Rolef Ben-Shahar T, Heeger S, Lehane C, East P, Flynn H, Skehel M, et al. Eco1-dependent cohesin acetylation during establishment of sister chromatid cohesion. *Science*. 2008;321(5888):563-6.

355. Unal E, Heidinger-Pauli JM, Kim W, Guacci V, Onn I, Gygi SP, et al. A molecular determinant for the establishment of sister chromatid cohesion. *Science*. 2008;321(5888):566-9.
356. Tanaka K, Hao Z, Kai M, Okayama H. Establishment and maintenance of sister chromatid cohesion in fission yeast by a unique mechanism. *EMBO J*. 2001;20(20):5779-90.
357. Hornig NC, Knowles PP, McDonald NQ, Uhlmann F. The dual mechanism of separase regulation by securin. *Curr Biol*. 2002;12(12):973-82.
358. Peters JM. The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol Cell*. 2002;9(5):931-43.
359. Alexandru G, Uhlmann F, Mechtler K, Poupart MA, Nasmyth K. Phosphorylation of the cohesin subunit Scc1 by Polo/Cdc5 kinase regulates sister chromatid separation in yeast. *Cell*. 2001;105(4):459-72.
360. Li S, Yue Z, Tanaka TU. Smc3 Deacetylation by Hos1 Facilitates Efficient Dissolution of Sister Chromatid Cohesion during Early Anaphase. *Mol Cell*. 2017;68(3):605-14 e4.
361. Guacci V, Koshland D, Strunnikov A. A direct link between sister chromatid cohesion and chromosome condensation revealed through the analysis of MCD1 in *S. cerevisiae*. *Cell*. 1997;91(1):47-57.
362. Marston AL. Chromosome segregation in budding yeast: sister chromatid cohesion and related mechanisms. *Genetics*. 2014;196(1):31-63.
363. Parelho V, Hadjur S, Spivakov M, Leleu M, Sauer S, Gregson HC, et al. Cohesins functionally associate with CTCF on mammalian chromosome arms. *Cell*. 2008;132(3):422-33.
364. Schmidt D, Schwalie PC, Ross-Innes CS, Hurtado A, Brown GD, Carroll JS, et al. A CTCF-independent role for cohesin in tissue-specific transcription. *Genome Res*. 2010;20(5):578-88.
365. Schuldiner O, Berdnik D, Levy JM, Wu JS, Luginbuhl D, Gontang AC, et al. piggyBac-based mosaic screen identifies a postmitotic function for cohesin in regulating developmental axon pruning. *Dev Cell*. 2008;14(2):227-38.
366. Donze D, Adams CR, Rine J, Kamakaka RT. The boundaries of the silenced HMR domain in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev*. 1999;13(6):698-708.
367. Chang CR, Wu CS, Hom Y, Gartenberg MR. Targeting of cohesin by transcriptionally silent chromatin. *Genes Dev*. 2005;19(24):3031-42.

368. Kobayashi T, Horiuchi T, Tongaonkar P, Vu L, Nomura M. SIR2 regulates recombination between different rDNA repeats, but not recombination within individual rRNA genes in yeast. *Cell*. 2004;117(4):441-53.
369. Kobayashi T, Ganley AR. Recombination regulation by transcription-induced cohesin dissociation in rDNA repeats. *Science*. 2005;309(5740):1581-4.
370. Maya-Miles D, Andujar E, Perez-Alegre M, Murillo-Pineda M, Barrientos-Moreno M, Cabello-Lobato MJ, et al. Crosstalk between chromatin structure, cohesin activity and transcription. *Epigenetics Chromatin*. 2019;12(1):47.
371. Lopez-Serra L, Kelly G, Patel H, Stewart A, Uhlmann F. The Scc2-Scc4 complex acts in sister chromatid cohesion and transcriptional regulation by maintaining nucleosome-free regions. *Nat Genet*. 2014;46(10):1147-51.
372. Putnam CD, Srivatsan A, Nene RV, Martinez SL, Clotfelter SP, Bell SN, et al. A genetic network that suppresses genome rearrangements in *Saccharomyces cerevisiae* and contains defects in cancers. *Nat Commun*. 2016;7:11256.
373. Pennaneach V, Putnam CD, Kolodner RD. Chromosome healing by de novo telomere addition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*. 2006;59(5):1357-68.
374. Chen C, Kolodner RD. Gross chromosomal rearrangements in *Saccharomyces cerevisiae* replication and recombination defective mutants. *Nat Genet*. 1999;23(1):81-5.
375. Chen C, Umezu K, Kolodner RD. Chromosomal rearrangements occur in *S. cerevisiae* rfa1 mutator mutants due to mutagenic lesions processed by double-strand-break repair. *Mol Cell*. 1998;2(1):9-22.
376. Putnam CD, Kolodner RD. Pathways and Mechanisms that Prevent Genome Instability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 2017;206(3):1187-225.
377. Schmidt KH, Pennaneach V, Putnam CD, Kolodner RD. Analysis of gross-chromosomal rearrangements in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol*. 2006;409:462-76.
378. Putnam CD, Pennaneach V, Kolodner RD. Chromosome healing through terminal deletions generated by de novo telomere additions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(36):13262-7.

379. Diede SJ, Gottschling DE. Telomerase-mediated telomere addition in vivo requires DNA primase and DNA polymerases alpha and delta. *Cell*. 1999;99(7):723-33.
380. Zhang W, Durocher D. De novo telomere formation is suppressed by the Mec1-dependent inhibition of Cdc13 accumulation at DNA breaks. *Genes Dev*. 2010;24(5):502-15.
381. Schulz VP, Zakian VA. The *Saccharomyces* PIF1 DNA helicase inhibits telomere elongation and de novo telomere formation. *Cell*. 1994;76(1):145-55.
382. Zhou J, Monson EK, Teng SC, Schulz VP, Zakian VA. Pif1p helicase, a catalytic inhibitor of telomerase in yeast. *Science*. 2000;289(5480):771-4.
383. Myung K, Chen C, Kolodner RD. Multiple pathways cooperate in the suppression of genome instability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*. 2001;411(6841):1073-6.
384. Putnam CD, Allen-Soltero SR, Martinez SL, Chan JE, Hayes TK, Kolodner RD. Bioinformatic identification of genes suppressing genome instability. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(47):E3251-9.
385. Makovets S, Blackburn EH. DNA damage signalling prevents deleterious telomere addition at DNA breaks. *Nat Cell Biol*. 2009;11(11):1383-6.
386. Kramer KM, Haber JE. New telomeres in yeast are initiated with a highly selected subset of TG1-3 repeats. *Genes Dev*. 1993;7(12A):2345-56.
387. Myung K, Kolodner RD. Induction of genome instability by DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair (Amst)*. 2003;2(3):243-58.
388. Mangahas JL, Alexander MK, Sandell LL, Zakian VA. Repair of chromosome ends after telomere loss in *Saccharomyces*. *Mol Biol Cell*. 2001;12(12):4078-89.
389. Murray AW, Claus TE, Szostak JW. Characterization of two telomeric DNA processing reactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 1988;8(11):4642-50.
390. Hughes TR, Weilbaecher RG, Walterscheid M, Lundblad V. Identification of the single-strand telomeric DNA binding domain of the *Saccharomyces cerevisiae* Cdc13 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(12):6457-62.
391. Negrini S, Ribaud V, Bianchi A, Shore D. DNA breaks are masked by multiple Rap1 binding in yeast: implications for telomere capping and telomerase regulation. *Genes Dev*. 2007;21(3):292-302.

392. Storey KB, Storey JM. Biochemical Adaptation to Extreme Environments. In: Walz W, editor. Integrative Physiology in the Proteomics and Post-Genomics Age: Humana Press; 2005. p. 169-200.
393. Carlson M. Glucose repression in yeast. *Curr Opin Microbiol*. 1999;2(2):202-7.
394. Gancedo JM. Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998;62(2):334-61.
395. Busti S, Coccetti P, Alberghina L, Vanoni M. Glucose signaling-mediated coordination of cell growth and cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. *Sensors (Basel)*. 2010;10(6):6195-240.
396. Rolland F, Winderickx J, Thevelein JM. Glucose-sensing and -signalling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Res*. 2002;2(2):183-201.
397. Maris AF, Assumpcao AL, Bonatto D, Brendel M, Henriques JA. Diauxic shift-induced stress resistance against hydroperoxides in *Saccharomyces cerevisiae* is not an adaptive stress response and does not depend on functional mitochondria. *Curr Genet*. 2001;39(3):137-49.
398. DeRisi JL, Iyer VR, Brown PO. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science*. 1997;278(5338):680-6.
399. Boveris A. Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. *Medicina (B Aires)*. 1998;58(4):350-6.
400. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol*. 1997;82(2):291-5.
401. Taymaz-Nikerel H, Cankorur-Cetinkaya A, Kirdar B. Genome-Wide Transcriptional Response of *Saccharomyces cerevisiae* to Stress-Induced Perturbations. *Front Bioeng Biotechnol*. 2016;4:17.
402. Aramburu J, Ortells MC, Tejedor S, Buxade M, Lopez-Rodriguez C. Transcriptional regulation of the stress response by mTOR. *Sci Signal*. 2014;7(332):re2.
403. Treitel MA, Carlson M. Repression by SSN6-TUP1 is directed by MIG1, a repressor/activator protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(8):3132-6.
404. De Vit MJ, Waddle JA, Johnston M. Regulated nuclear translocation of the Mig1 glucose repressor. *Mol Biol Cell*. 1997;8(8):1603-18.

405. Jiang R, Carlson M. The Snf1 protein kinase and its activating subunit, Snf4, interact with distinct domains of the Sip1/Sip2/Gal83 component in the kinase complex. *Mol Cell Biol.* 1997;17(4):2099-106.
406. Jiang R, Carlson M. Glucose regulates protein interactions within the yeast SNF1 protein kinase complex. *Genes Dev.* 1996;10(24):3105-15.
407. Haurie V, Perrot M, Mini T, Jenö P, Sogliocco F, Boucherie H. The transcriptional activator Cat8p provides a major contribution to the reprogramming of carbon metabolism during the diauxic shift in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 2001;276(1):76-85.
408. De Winder JH, L.A. Grivell LA. Global Regulation of Mitochondrial Biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology.* 46: Elsevier Inc.; 1993. p. 51-91.
409. Boy-Marcotte E, Perrot M, Bussereau F, Boucherie H, Jacquet M. Msn2p and Msn4p control a large number of genes induced at the diauxic transition which are repressed by cyclic AMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 1998;180(5):1044-52.
410. Andrulis ED, Neiman AM, Zappulla DC, Sternglanz R. Perinuclear localization of chromatin facilitates transcriptional silencing. *Nature.* 1998;394(6693):592-5.
411. Ferreira HC, Luke B, Schober H, Kalck V, Lingner J, Gasser SM. The PIAS homologue Siz2 regulates perinuclear telomere position and telomerase activity in budding yeast. *Nat Cell Biol.* 2011;13(7):867-74.
412. Guidi M, Ruault M, Marbouty M, Loiodice I, Cournac A, Billaudeau C, et al. Spatial reorganization of telomeres in long-lived quiescent cells. *Genome Biol.* 2015;16:206.
413. Maestroni L, Audry J, Matmati S, Arcangioli B, Geli V, Coulon S. Eroded telomeres are rearranged in quiescent fission yeast cells through duplications of subtelomeric sequences. *Nat Commun.* 2017;8(1):1684.
414. Moore JK, Haber JE. Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 1996;16(5):2164-73.
415. Takata M, Sasaki MS, Sonoda E, Morrison C, Hashimoto M, Utsumi H, et al. Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair

have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J.* 1998;17(18):5497-508.

416. Paques F, Haber JE. Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1999;63(2):349-404.

417. Counter CM, Meyerson M, Eaton EN, Weinberg RA. The catalytic subunit of yeast telomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(17):9202-7.

418. Bianchi A, Negrini S, Shore D. Delivery of yeast telomerase to a DNA break depends on the recruitment functions of Cdc13 and Est1. *Mol Cell.* 2004;16(1):139-46.

419. Bianchi A, Shore D. How telomerase reaches its end: mechanism of telomerase regulation by the telomeric complex. *Mol Cell.* 2008;31(2):153-65.

420. Chung WH, Zhu Z, Papusha A, Malkova A, Ira G. Defective resection at DNA double-strand breaks leads to de novo telomere formation and enhances gene targeting. *PLoS Genet.* 2010;6(5):e1000948.

421. Ribaud V, Ribeyre C, Damay P, Shore D. DNA-end capping by the budding yeast transcription factor and subtelomeric binding protein Tbf1. *EMBO J.* 2012;31(1):138-49.

422. Lydeard JR, Lipkin-Moore Z, Jain S, Eapen VV, Haber JE. Sgs1 and exo1 redundantly inhibit break-induced replication and de novo telomere addition at broken chromosome ends. *PLoS Genet.* 2010;6(5):e1000973.

423. Ricchetti M, Dujon B, Fairhead C. Distance from the chromosome end determines the efficiency of double strand break repair in subtelomeres of haploid yeast. *J Mol Biol.* 2003;328(4):847-62.

424. Ribeyre C, Shore D. Regulation of telomere addition at DNA double-strand breaks. *Chromosoma.* 2013;122(3):159-73.

425. Teixeira MT, Forstemann K, Gasser SM, Lingner J. Intracellular trafficking of yeast telomerase components. *EMBO Rep.* 2002;3(7):652-9.

426. Bajon E, Laterreur N, Wellinger RJ. A Single Templating RNA in Yeast Telomerase. *Cell Rep.* 2015;12(3):441-8.

427. Lisby M, Mortensen UH, Rothstein R. Colocalization of multiple DNA double-strand breaks at a single Rad52 repair centre. *Nat Cell Biol.* 2003;5(6):572-7.

428. Phillips JA, Chan A, Paeschke K, Zakian VA. The pif1 helicase, a negative regulator of telomerase, acts preferentially at long telomeres. *PLoS Genet*. 2015;11(4):e1005186.
429. Chen J, Stubbe J. Bleomycins: towards better therapeutics. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(2):102-12.
430. Alani E, Thresher R, Griffith JD, Kolodner RD. Characterization of DNA-binding and strand-exchange stimulation properties of γ -RPA, a yeast single-strand-DNA-binding protein. *J Mol Biol*. 1992;227(1):54-71.
431. Krogh BO, Symington LS. Recombination proteins in yeast. *Annu Rev Genet*. 2004;38:233-71.
432. Gasior SL, Wong AK, Kora Y, Shinohara A, Bishop DK. Rad52 associates with RPA and functions with rad55 and rad57 to assemble meiotic recombination complexes. *Genes Dev*. 1998;12(14):2208-21.
433. Raderschall E, Golub EI, Haaf T. Nuclear foci of mammalian recombination proteins are located at single-stranded DNA regions formed after DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(5):1921-6.
434. Barlow JH, Lisby M, Rothstein R. Differential regulation of the cellular response to DNA double-strand breaks in G1. *Mol Cell*. 2008;30(1):73-85.
435. Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol*. 1999;146(5):905-16.
436. Mazumder A, Tummler K, Bathe M, Samson LD. Single-cell analysis of ribonucleotide reductase transcriptional and translational response to DNA damage. *Mol Cell Biol*. 2013;33(3):635-42.
437. Martina M, Clerici M, Baldo V, Bonetti D, Lucchini G, Longhese MP. A balance between Tel1 and Rif2 activities regulates nucleolytic processing and elongation at telomeres. *Mol Cell Biol*. 2012;32(9):1604-17.
438. Maeda D, Seki M, Onoda F, Brnzei D, Kawabe Y, Enomoto T. Ubc9 is required for damage-tolerance and damage-induced interchromosomal homologous recombination in *S. cerevisiae*. *DNA Repair (Amst)*. 2004;3(3):335-41.

439. Branzei D, Sollier J, Liberi G, Zhao X, Maeda D, Seki M, et al. Ubc9- and mms21-mediated sumoylation counteracts recombinogenic events at damaged replication forks. *Cell*. 2006;127(3):509-22.
440. Zhao X, Blobel G. A SUMO ligase is part of a nuclear multiprotein complex that affects DNA repair and chromosomal organization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(13):4777-82.
441. Sugawara N, Ivanov EL, Fishman-Lobell J, Ray BL, Wu X, Haber JE. DNA structure-dependent requirements for yeast RAD genes in gene conversion. *Nature*. 1995;373(6509):84-6.
442. Obodo UC, Epum EA, Platts MH, Seloff J, Dahlson NA, Velkovsky SM, et al. Endogenous Hot Spots of De Novo Telomere Addition in the Yeast Genome Contain Proximal Enhancers That Bind Cdc13. *Mol Cell Biol*. 2016;36(12):1750-63.
443. Wong JM, Kusdra L, Collins K. Subnuclear shuttling of human telomerase induced by transformation and DNA damage. *Nat Cell Biol*. 2002;4(9):731-6.
444. Wach A, Brachat A, Pohlmann R, Philippsen P. New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 1994;10(13):1793-808.
445. Zhao X, Muller EG, Rothstein R. A suppressor of two essential checkpoint genes identifies a novel protein that negatively affects dNTP pools. *Mol Cell*. 1998;2(3):329-40.
446. Chandra A, Hughes TR, Nugent CI, Lundblad V. Cdc13 both positively and negatively regulates telomere replication. *Genes Dev*. 2001;15(4):404-14.
447. Knop M, Siegers K, Pereira G, Zachariae W, Winsor B, Nasmyth K, et al. Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast*. 1999;15(10B):963-72.
448. Sedelnikova OA, Rogakou EP, Panyutin IG, Bonner WM. Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody. *Radiat Res*. 2002;158(4):486-92.
449. Pfingsten JS, Goodrich KJ, Taabazuing C, Ouenzar F, Chartrand P, Cech TR. Mutually exclusive binding of telomerase RNA and DNA by Ku alters telomerase recruitment model. *Cell*. 2012;148(5):922-32.
450. Gallardo F, Chartrand P. Visualizing mRNAs in fixed and living yeast cells. *Methods Mol Biol*. 2011;714:203-19.

451. Putnam CD, Kolodner RD. Determination of gross chromosomal rearrangement rates. Cold Spring Harb Protoc. 2010;2010(9):pdb prot5492.
452. Motegi A, Myung K. Measuring the rate of gross chromosomal rearrangements in *Saccharomyces cerevisiae*: A practical approach to study genomic rearrangements observed in cancer. Methods. 2007;41(2):168-76.
453. Afgan E, Baker D, van den Beek M, Blankenberg D, Bouvier D, Cech M, et al. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2016 update. Nucleic Acids Res. 2016;44(W1):W3-W10.
454. Zampini E, Lepage E, Tremblay-Belzile S, Truche S, Brisson N. Organelle DNA rearrangement mapping reveals U-turn-like inversions as a major source of genomic instability in *Arabidopsis* and humans. Genome Res. 2015;25(5):645-54.
455. Star B, Nederbragt AJ, Hansen MH, Skage M, Gilfillan GD, Bradbury IR, et al. Palindromic sequence artifacts generated during next generation sequencing library preparation from historic and ancient DNA. PLoS One. 2014;9(3):e89676.
456. Arnoult N, Van Beneden A, Decottignies A. Telomere length regulates TERRA levels through increased trimethylation of telomeric H3K9 and HP1alpha. Nat Struct Mol Biol. 2012;19(9):948-56.
457. Beishline K, Vladimirova O, Tutton S, Wang Z, Deng Z, Lieberman PM. CTCF driven TERRA transcription facilitates completion of telomere DNA replication. Nat Commun. 2017;8(1):2114.
458. Wang Z, Lieberman PM. The crosstalk of telomere dysfunction and inflammation through cell-free TERRA containing exosomes. RNA Biol. 2016;13(8):690-5.
459. Brauer MJ, Saldanha AJ, Dolinski K, Botstein D. Homeostatic adjustment and metabolic remodeling in glucose-limited yeast cultures. Mol Biol Cell. 2005;16(5):2503-17.
460. Doksan Y, de Lange T. The role of double-strand break repair pathways at functional and dysfunctional telomeres. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2014;6(12):a016576.
461. Lue NF, Yu EY. Telomere recombination pathways: tales of several unhappy marriages. Curr Genet. 2017;63(3):401-9.
462. Gadaleta MC, Gonzalez-Medina A, Noguchi E. Timeless protection of telomeres. Curr Genet. 2016;62(4):725-30.

463. Jain D, Cooper JP. Telomeric strategies: means to an end. *Annu Rev Genet.* 2010;44:243-69.
464. Millet C, Makovets S. Aneuploidy as a mechanism of adaptation to telomerase insufficiency. *Curr Genet.* 2016;62(3):557-64.
465. Flynn RL, Centore RC, O'Sullivan RJ, Rai R, Tse A, Songyang Z, et al. TERRA and hnRNPA1 orchestrate an RPA-to-POT1 switch on telomeric single-stranded DNA. *Nature.* 2011;471(7339):532-6.
466. Porro A, Feuerhahn S, Delafontaine J, Riethman H, Rougemont J, Lingner J. Functional characterization of the TERRA transcriptome at damaged telomeres. *Nat Commun.* 2014;5:5379.
467. Porro A, Feuerhahn S, Lingner J. TERRA-reinforced association of LSD1 with MRE11 promotes processing of uncapped telomeres. *Cell Rep.* 2014;6(4):765-76.
468. Cusanelli E, Chartrand P. Telomeric noncoding RNA: telomeric repeat-containing RNA in telomere biology. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2014;5(3):407-19.
469. Murphy JP, Stepanova E, Everley RA, Paulo JA, Gygi SP. Comprehensive Temporal Protein Dynamics during the Diauxic Shift in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Proteomics.* 2015;14(9):2454-65.
470. Teste MA, Duquenne M, Francois JM, Parrou JL. Validation of reference genes for quantitative expression analysis by real-time RT-PCR in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Mol Biol.* 2009;10:99.
471. Chen CY, Ezzeddine N, Shyu AB. Messenger RNA half-life measurements in mammalian cells. *Methods Enzymol.* 2008;448:335-57.
472. Gasch AP, Spellman PT, Kao CM, Carmel-Harel O, Eisen MB, Storz G, et al. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell.* 2000;11(12):4241-57.
473. Moradi-Fard S, Sarthi J, Tittel-Elmer M, Lalonde M, Cusanelli E, Chartrand P, et al. Smc5/6 Is a Telomere-Associated Complex that Regulates Sir4 Binding and TPE. *PLoS Genet.* 2016;12(8):e1006268.

474. Taddei A, Van Houwe G, Nagai S, Erb I, van Nimwegen E, Gasser SM. The functional importance of telomere clustering: global changes in gene expression result from SIR factor dispersion. *Genome Res.* 2009;19(4):611-25.
475. Tung SY, Lee KW, Hong JY, Lee SP, Shen HH, Liou GG. Changes in the genome-wide localization pattern of Sir3 in *Saccharomyces cerevisiae* during different growth stages. *Comput Struct Biotechnol J.* 2013;7:e201304001.
476. Nautiyal S, DeRisi JL, Blackburn EH. The genome-wide expression response to telomerase deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(14):9316-21.
477. Peng B, Williams TC, Henry M, Nielsen LK, Vickers CE. Controlling heterologous gene expression in yeast cell factories on different carbon substrates and across the diauxic shift: a comparison of yeast promoter activities. *Microb Cell Fact.* 2015;14:91.
478. Galdieri L, Mehrotra S, Yu S, Vancura A. Transcriptional regulation in yeast during diauxic shift and stationary phase. *OMICS.* 2010;14(6):629-38.
479. Pedruzzi I, Burckert N, Egger P, De Virgilio C. *Saccharomyces cerevisiae* Ras/cAMP pathway controls post-diauxic shift element-dependent transcription through the zinc finger protein Gis1. *EMBO J.* 2000;19(11):2569-79.
480. Arora R, Lee Y, Wischnewski H, Brun CM, Schwarz T, Azzalin CM. RNaseH1 regulates TERRA-telomeric DNA hybrids and telomere maintenance in ALT tumour cells. *Nat Commun.* 2014;5:5220.
481. Balk B, Maicher A, Dees M, Klermund J, Luke-Glaser S, Bender K, et al. Telomeric RNA-DNA hybrids affect telomere-length dynamics and senescence. *Nat Struct Mol Biol.* 2013;20(10):1199-205.
482. de Lange T. How telomeres solve the end-protection problem. *Science.* 2009;326(5955):948-52.
483. Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell.* 1985;43(2 Pt 1):405-13.
484. Makrantonis V, Marston AL. Cohesin and chromosome segregation. *Curr Biol.* 2018;28(12):R688-R93.

485. Bloom MS, Koshland D, Guacci V. Cohesin Function in Cohesion, Condensation, and DNA Repair Is Regulated by Wpl1p via a Common Mechanism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 2018;208(1):111-24.
486. Kothiwal D, Laloraya S. A SIR-independent role for cohesin in subtelomeric silencing and organization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(12):5659-64.
487. Robin JD, Ludlow AT, Batten K, Magdinier F, Stadler G, Wagner KR, et al. Telomere position effect: regulation of gene expression with progressive telomere shortening over long distances. *Genes Dev*. 2014;28(22):2464-76.
488. Marcand S, Brevet V, Gilson E. Progressive cis-inhibition of telomerase upon telomere elongation. *EMBO J*. 1999;18(12):3509-19.
489. Hass EP, Zappulla DC. The Ku subunit of telomerase binds Sir4 to recruit telomerase to lengthen telomeres in *S. cerevisiae*. *Elife*. 2015;4.
490. Deng Z, Wang Z, Stong N, Plasschaert R, Moczan A, Chen HS, et al. A role for CTCF and cohesin in subtelomere chromatin organization, TERRA transcription, and telomere end protection. *EMBO J*. 2012;31(21):4165-78.
491. Leteurtre F, Li X, Gluckman E, Carosella ED. Telomerase activity during the cell cycle and in gamma-irradiated hematopoietic cells. *Leukemia*. 1997;11(10):1681-9.
492. Strecker J, Stinus S, Caballero MP, Szilard RK, Chang M, Durocher D. A sharp Pif1-dependent threshold separates DNA double-strand breaks from critically short telomeres. *Elife*. 2017;6.
493. Epum EA, Mohan MJ, Ruppe NP, Friedman KL. Interaction of yeast Rad51 and Rad52 relieves Rad52-mediated inhibition of de novo telomere addition. *PLoS Genet*. 2020;16(2):e1008608.
494. Regulus P, Duroux B, Bayle PA, Favier A, Cadet J, Ravanat JL. Oxidation of the sugar moiety of DNA by ionizing radiation or bleomycin could induce the formation of a cluster DNA lesion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(35):14032-7.
495. Yan Z, Xue C, Kumar S, Crickard JB, Yu Y, Wang W, et al. Rad52 Restrains Resection at DNA Double-Strand Break Ends in Yeast. *Mol Cell*. 2019;76(5):699-711 e6.

496. Chung I, Zhao X. DNA break-induced sumoylation is enabled by collaboration between a SUMO ligase and the ssDNA-binding complex RPA. *Genes Dev.* 2015;29(15):1593-8.
497. Zilio N, Eifler-Olivi K, Ulrich HD. Functions of SUMO in the Maintenance of Genome Stability. *Adv Exp Med Biol.* 2017;963:51-87.
498. Motegi A, Kuntz K, Majeed A, Smith S, Myung K. Regulation of gross chromosomal rearrangements by ubiquitin and SUMO ligases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 2006;26(4):1424-33.
499. Giaever G, Chu AM, Ni L, Connelly C, Riles L, Veronneau S, et al. Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature.* 2002;418(6896):387-91.
500. Alexander RP, Fang G, Rozowsky J, Snyder M, Gerstein MB. Annotating non-coding regions of the genome. *Nat Rev Genet.* 2010;11(8):559-71.
501. Hurowitz EH, Brown PO. Genome-wide analysis of mRNA lengths in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Biol.* 2003;5(1):R2.
502. Antoniaci LM, Kenna MA, Uetz P, Fields S, Skibbens RV. The spindle pole body assembly component mps3p/nep98p functions in sister chromatid cohesion. *J Biol Chem.* 2004;279(47):49542-50.
503. Yu H, Braun P, Yildirim MA, Lemmens I, Venkatesan K, Sahalie J, et al. High-quality binary protein interaction map of the yeast interactome network. *Science.* 2008;322(5898):104-10.
504. Bommi JR, Rao H, Challa K, Higashide M, Shinmyozu K, Nakayama JI, et al. Meiosis-specific cohesin component, Rec8, promotes the localization of Mps3 SUN domain protein on the nuclear envelope. *Genes Cells.* 2019;24(1):94-106.
505. Katta SS, Chen J, Gardner JM, Friederichs JM, Smith SE, Gogol M, et al. Sec66-Dependent Regulation of Yeast Spindle-Pole Body Duplication Through Pom152. *Genetics.* 2015;201(4):1479-95.
506. Mayer ML, Gygi SP, Aebersold R, Hieter P. Identification of RFC(Ctf18p, Ctf8p, Dcc1p): an alternative RFC complex required for sister chromatid cohesion in *S. cerevisiae*. *Mol Cell.* 2001;7(5):959-70.

507. Haas J, Lemoncelli A, Morozov C, Franke K, Dominder J, Antoniaci LM. Physical links between the nuclear envelope protein Mps3, three alternate replication factor C complexes, and a variant histone in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Cell Biol.* 2012;31(6):917-24.
508. Friederichs JM, Gardner JM, Smoyer CJ, Whetstine CR, Gogol M, Slaughter BD, et al. Genetic analysis of Mps3 SUN domain mutants in *Saccharomyces cerevisiae* reveals an interaction with the SUN-like protein Slp1. *G3 (Bethesda).* 2012;2(12):1703-18.
509. Diman A, Boros J, Poulain F, Rodriguez J, Purnelle M, Episkopou H, et al. Nuclear respiratory factor 1 and endurance exercise promote human telomere transcription. *Sci Adv.* 2016;2(7):e1600031.
510. Gao Y, Zhang J, Liu Y, Zhang S, Wang Y, Liu B, et al. Regulation of TERRA on telomeric and mitochondrial functions in IPF pathogenesis. *BMC Pulm Med.* 2017;17(1):163.
511. Galigniana NM, Charo NL, Uranga R, Cabanillas AM, Piwien-Pilipuk G. Oxidative stress induces transcription of telomeric repeat-containing RNA (TERRA) by engaging PKA signaling and cytoskeleton dynamics. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2020;1867(4):118643.
512. Koskas S, Decottignies A, Dufour S, Pezet M, Verdel A, Vourc'h C, et al. Heat shock factor 1 promotes TERRA transcription and telomere protection upon heat stress. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(11):6321-33.
513. Maestroni L, Reyes C, Vours M, Gachet Y, Tournier S, Geli V, et al. Nuclear envelope attachment of telomeres limits TERRA and telomeric rearrangements in quiescent fission yeast cells. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(6):3029-41.
514. Scarpulla RC. Nuclear control of respiratory chain expression by nuclear respiratory factors and PGC-1-related coactivator. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1147:321-34.
515. Swiecilo A. Cross-stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae* yeast--new insight into an old phenomenon. *Cell Stress Chaperones.* 2016;21(2):187-200.
516. Ellahi A, Thurtle DM, Rine J. The Chromatin and Transcriptional Landscape of Native *Saccharomyces cerevisiae* Telomeres and Subtelomeric Domains. *Genetics.* 2015;200(2):505-21.
517. Smith JJ, Miller LR, Kreisberg R, Vazquez L, Wan Y, Aitchison JD. Environment-responsive transcription factors bind subtelomeric elements and regulate gene silencing. *Mol Syst Biol.* 2011;7:455.

518. Oh BK, Choi Y, Bae J, Lee WM, Hoh JK, Choi JS. Increased amounts and stability of telomeric repeat-containing RNA (TERRA) following DNA damage induced by etoposide. *PLoS One*. 2019;14(11):e0225302.
519. Avogaro L, Querido E, Dalachi M, Jantsch MF, Chartrand P, Cusanelli E. Live-cell imaging reveals the dynamics and function of single-telomere TERRA molecules in cancer cells. *RNA Biol*. 2018;15(6):787-96.
520. Wang Z, Deng Z, Dahmane N, Tsai K, Wang P, Williams DR, et al. Telomeric repeat-containing RNA (TERRA) constitutes a nucleoprotein component of extracellular inflammatory exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(46):E6293-300.
521. Vermeulen W, Fousteri M. Mammalian transcription-coupled excision repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(8):a012625.
522. de Padula M, Slezak G, Auffret van Der Kemp P, Boiteux S. The post-replication repair RAD18 and RAD6 genes are involved in the prevention of spontaneous mutations caused by 7,8-dihydro-8-oxoguanine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(17):5003-10.
523. Lee TH, Kang TH. DNA Oxidation and Excision Repair Pathways. *Int J Mol Sci*. 2019;20(23).
524. Hosseini M, Ezzedine K, Taieb A, Rezvani HR. Oxidative and energy metabolism as potential clues for clinical heterogeneity in nucleotide excision repair disorders. *J Invest Dermatol*. 2015;135(2):341-51.
525. Coluzzi E, Leone S, Sgura A. Oxidative Stress Induces Telomere Dysfunction and Senescence by Replication Fork Arrest. *Cells*. 2019;8(1).
526. Li Z, Malla S, Shin B, Li JM. Battle against RNA oxidation: molecular mechanisms for reducing oxidized RNA to protect cells. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2014;5(3):335-46.
527. Kong Q, Lin CL. Oxidative damage to RNA: mechanisms, consequences, and diseases. *Cell Mol Life Sci*. 2010;67(11):1817-29.
528. Coluzzi E, Colamartino M, Cozzi R, Leone S, Meneghini C, O'Callaghan N, et al. Oxidative stress induces persistent telomeric DNA damage responsible for nuclear morphology change in mammalian cells. *PLoS One*. 2014;9(10):e110963.
529. Oikawa S, Kawanishi S. Site-specific DNA damage at GGG sequence by oxidative stress may accelerate telomere shortening. *FEBS Lett*. 1999;453(3):365-8.

530. Radak Z, Boldogh I. 8-Oxo-7,8-dihydroguanine: links to gene expression, aging, and defense against oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2010;49(4):587-96.
531. Marion RM, Montero JJ, Lopez de Silanes I, Grana-Castro O, Martinez P, Schoeftner S, et al. TERRA regulate the transcriptional landscape of pluripotent cells through TRF1-dependent recruitment of PRC2. *Elife*. 2019;8.
532. Deng Z, Norseen J, Wiedmer A, Riethman H, Lieberman PM. TERRA RNA binding to TRF2 facilitates heterochromatin formation and ORC recruitment at telomeres. *Mol Cell*. 2009;35(4):403-13.
533. Montero JJ, Lopez-Silanes I, Megias D, M FF, Castells-Garcia A, Blasco MA. TERRA recruitment of polycomb to telomeres is essential for histone trimethylation marks at telomeric heterochromatin. *Nat Commun*. 2018;9(1):1548.
534. Wang X, Goodrich KJ, Gooding AR, Naeem H, Archer S, Paucek RD, et al. Targeting of Polycomb Repressive Complex 2 to RNA by Short Repeats of Consecutive Guanines. *Mol Cell*. 2017;65(6):1056-67 e5.
535. Cheong VV, Heddi B, Lech CJ, Phan AT. Xanthine and 8-oxoguanine in G-quadruplexes: formation of a G.G.X.O tetrad. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(21):10506-14.
536. Bielskute S, Plavec J, Podbevsek P. Impact of Oxidative Lesions on the Human Telomeric G-Quadruplex. *J Am Chem Soc*. 2019;141(6):2594-603.
537. Claussin C, Chang M. The many facets of homologous recombination at telomeres. *Microb Cell*. 2015;2(9):308-21.

Annexe 1 – Smc5/6 est un complexe associé aux télomères et régule la liaison de Sir4 au télomère ainsi que l'effet de position télomérique (TPE)

Smc5/6 Is a Telomere-Associated Complex that Regulates Sir4 Binding and TPE

Auteurs: Sarah Moradi-Fard, Jessica Sarthi², Mireille Tittel-Elmer², Maxime Lalonde, Emilio Cusanelli, Pascal Chartrand, Jennifer A. Cobb

Publié dans : PLOS Genetics en 2016

RESEARCH ARTICLE

Smc5/6 Is a Telomere-Associated Complex that Regulates Sir4 Binding and TPE

Sarah Moradi-Fard¹, Jessica Sarthi¹, Mireille Tittel-Elmer¹, Maxime Lalonde², Emilio Cusanelli^{2*}, Pascal Chartrand², Jennifer A. Cobb^{1*}

1 Departments of Biochemistry & Molecular Biology and Oncology, Robson DNA Science Centre, Arnie Charbonneau Cancer Institute, Cumming School of Medicine, University of Calgary, Calgary, Alberta, Canada, **2** Département de Biochimie, Université de Montréal, Montréal, Quebec, Canada

☞ These authors contributed equally to this work.

✉ Current Address: Max F. Perutz Laboratories, Department of Chromosome Biology, University of Vienna, Vienna, Austria

* jcobb@ucalgary.ca



CrossMark
click for updates

OPEN ACCESS

Citation: Moradi-Fard S, Sarthi J, Tittel-Elmer M, Lalonde M, Cusanelli E, Chartrand P, et al. (2016) Smc5/6 Is a Telomere-Associated Complex that Regulates Sir4 Binding and TPE. *PLoS Genet* 12(8): e1006268. doi:10.1371/journal.pgen.1006268

Editor: Peter McKinnon, St Jude Children's Research Hospital, UNITED STATES

Received: November 2, 2015

Accepted: July 28, 2016

Published: August 26, 2016

Copyright: © 2016 Moradi-Fard et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research MOP-82736; MOP-137062 and Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada 418122 awarded to JC, Canadian Institutes of Health Research MOP-89768 awarded to PC. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors declare that they have no conflict of interest.

Abstract

SMC proteins constitute the core members of the Smc5/6, cohesin and condensin complexes. We demonstrate that Smc5/6 is present at telomeres throughout the cell cycle and its association with chromosome ends is dependent on Nse3, a subcomponent of the complex. Cells harboring a temperature sensitive mutant, *nse3-1*, are defective in Smc5/6 localization to telomeres and have slightly shorter telomeres. Nse3 interacts physically and genetically with two Rap1-binding factors, Rif2 and Sir4. Reduction in telomere-associated Smc5/6 leads to defects in telomere clustering, dispersion of the silencing factor, Sir4, and a loss in transcriptional repression for sub-telomeric genes and non-coding telomeric repeat-containing RNA (TERRA). *SIR4* recovery at telomeres is reduced in cells lacking Smc5/6 functionality and vice versa. However, *nse3-1/sir4* Δ double mutants show additive defects for telomere shortening and TPE indicating the contribution of Smc5/6 to telomere homeostasis is only in partial overlap with SIR factor silencing. These findings support a role for Smc5/6 in telomere maintenance that is separate from its canonical role(s) in HR-mediated events during replication and telomere elongation.

Author Summary

Structural Maintenance of Chromosome (SMC) complexes, include cohesin, condensin, and the Smc5/6 complex. These complexes are involved in many aspects of chromosome organization, with cohesin and condensin having relatively well-characterized roles. Cohesin holds newly replicated DNA strands together and condensin is critical for chromosome condensation and genome compaction as cells enter mitosis. However, a role for the Smc5/6 complex in higher-level chromosome organization has remained ill defined. The Smc5/6 complex is recovered at chromosome ends in all stages of the cell cycle and has a role in telomere biology. Smc5/6 integrity is necessary for Sir4 binding, telomere clustering, and transcriptional silencing. In all, our data suggest that Smc5/6 has a physiologically

relevant role in chromatin maintenance at telomeres and telomere organization within the nucleus that are distinct of its functionality in homologous recombination.

Introduction

Structural maintenance of chromosome (SMC) protein complexes facilitate chromosome structure and organization in eukaryotes. Three SMC complexes are found in eukaryotes and each has a unique role in chromosome dynamics and metabolism. Underscoring their importance and distinct functionality, all three complexes and their individual components are essential for cell viability. Cohesin regulates sister chromatid cohesion and condensin is important for chromosome compaction by tethering different regions of the same chromosome [1–3].

The third complex, Smc5/6, contains six non-SMC proteins in addition to Smc5 and 6 including Mms21/ non-Smc element 2 (Nse2), which is an E3 SUMO ligase (Fig 1A) [4–6]. As well, Nse1 and Nse3 bind to Nse4 to form a heterotrimer, which in turn interacts with the ATPase head domain generated by the N- and C-termini of Smc5 and Smc6 [7, 8]. Nse1 is a putative ubiquitin ligase and Nse3 is a MAGE (melanoma-associated antigen gene) domain containing protein that is important for loading the complex onto chromatin [9–11]. The Smc5/6 complex functions in homologous recombination (HR) and replication, and it localizes to repetitive elements such as the rDNA and telomeres presumably to promote and resolve HR-dependent intermediates [12–14].

A telomeric function for the Smc5/6 complex in ALT has been demonstrated in both human and yeast cells [22–24]. In human ALT cells, a knockdown of components in the Smc5/6 complex inhibits recombination at telomeres, resulting in telomere shortening and senescence [22]. As well, in telomerase negative yeast cells *smc6-9* and *mms21-11* mutant alleles exhibited accelerated senescence attributed to the accumulation of recombination intermediates, but also to an HR-independent mechanism involving the untimely termination of DNA replication [23, 24]. The Smc5/6 complex is enriched at telomeres in telomerase positive asynchronous cultures [12, 13], however its characterization outside the ALT pathway remains limited. In telomerase positive cells, the *smc6-9* allele exhibited mis-segregation of repetitive elements at telomeres which is attributed to defects in HR [12] and the *mms21-11* allele was shown to have defects in telomere clustering with increased telomere position effect (TPE) [4]. Subsequent to the initial characterization of *mms21-11*, *mms21Δsl* mutants showed a loss of TPE and SIR binding [25]. Thus, allele specific variations have complicated the understanding of Mms21 and SUMO mediated events in TPE [4, 25]. Further characterization of Smc5/6 in telomere homeostasis using a mutant allele of a distinct complex component will provide additional information about the functionality of Smc5/6 at telomeres.

Telomeric DNA in *S. cerevisiae* contains tandem repeats of $(AC_{1-3}/TG_{1-3})_n$; $n = 275–375$ [26] along with two types of subtelomeric repeat elements called Y' and X [27]. The Y' sequence is located adjacent to the tandem repeats at many, but not all subtelomeres, whereas X-elements are found at the ends of all chromosomes [28]. Rap1 binds directly to the double-stranded TG_{1-3} DNA moiety and is a central regulator of telomere biology [29]. The C-terminal domain of Rap1 interacts with Rif1 and Rif2 and regulates telomere length via a counting system that involves their interaction with Rap1 [30, 31]. Telomeres are elongated in *rif1Δ* and *rif2Δ* cells via telomerase dependent and HR independent events [32, 33].

The C-terminal domain of Rap1 also binds the SIR complex, which is important for transcriptional silencing primarily via interactions with Sir4 [30, 32, 34, 35]. SIR proteins are important for telomere position effect (TPE) and the formation of heterochromatin, which nucleates at telomeres and then spreads several kilobases into subtelomeric regions [36, 37].

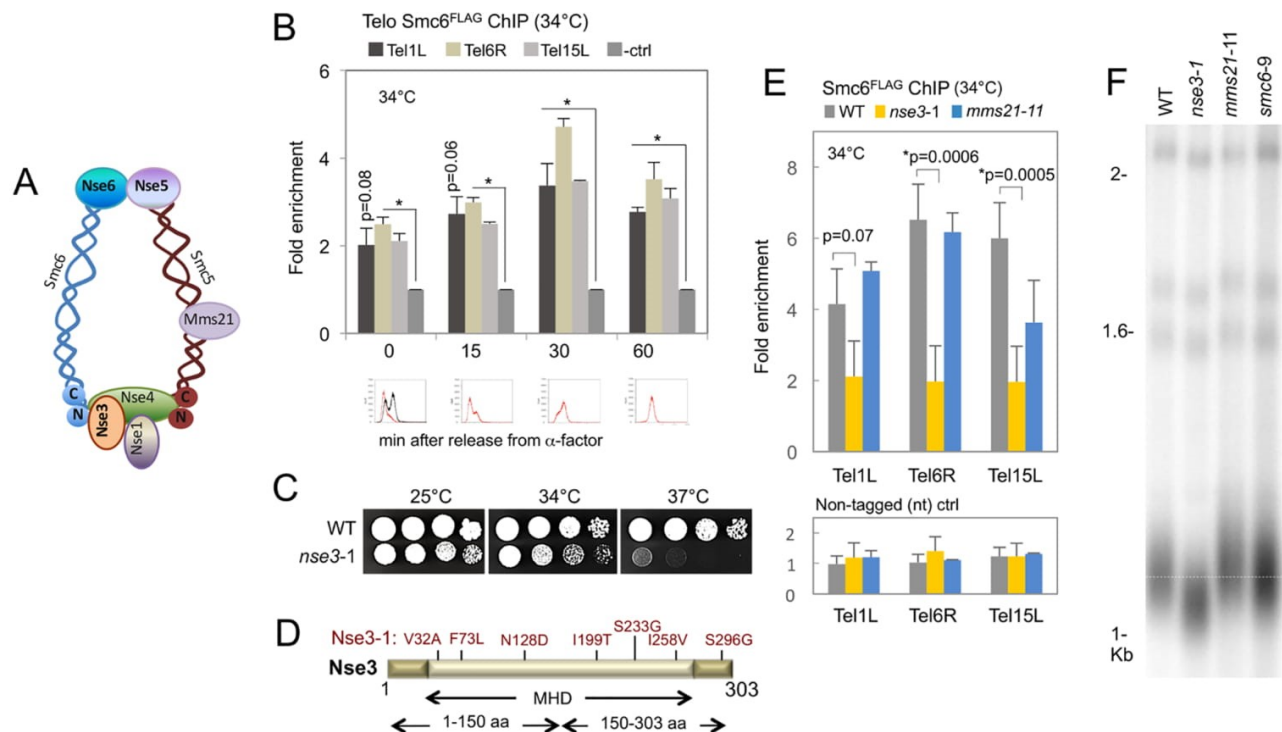


Fig 1. Smc5/6 is a telomere binding complex. (A) A schematic representation of the Smc5/6 complex showing the location of Nse3 as part of a trimeric sub-complex located at the head region where Smc5 and Smc6 meet. (B) Chromatin immunoprecipitation (ChIP) followed by qPCR was performed on Smc6^{FLAG} (JC1594) at the indicated time points after release from α-factor. The fold enrichment at three native subtelomeres (Tel1L, Tel6R and Tel15L) compared to a control (ctrl) late replicating region on Chromosome V (469104–469177) is reported with the mean ± SD for n ≥ 3 experiments performed in technical duplicate. (*) Indicates a statistically significant level of enrichment compared to the ctrl with p values < .05 by a two-tailed t-test. Smc6^{FLAG} enrichment at Tel1L is higher at 0 and 15 minutes after release, but with p values = 0.08 and p = 0.06 respectively. The lower panels show flow cytometry on ChIP samples with an asynchronous culture shown in black at the 0 time point. (C) Drop assay of exponentially growing wild type (JC470) and *nse3-1* (JC3607) cells that were grown for 48 hours at the indicated temperatures on YPAD and 1:5 serial dilutions. (D) Schematic diagram of Nse3. “MHD” represents Melanoma Homology Domain in Nse3 protein. Seven amino acid substitutions in Nse3-1 are shown in red. (E) Chromatin immunoprecipitation (ChIP) on Smc6^{FLAG} in wild type (JC1594), *nse3-1* (JC2630), *mms21-11* (JC2075) and the non-tagged (nt) control strains for wild type (JC470), *nse3-1* (JC3607), and *mms21-11* (JC1879) in asynchronous cultures. The fold enrichment levels are relative to the late-replicating control region on Chr V for n = 3 experiments with the mean ± SD. All primers are listed in S2 Table. Enrichment levels for wild type and mutant cells with p values < .05 from a two-tailed t-test are indicated by (*). (F) Telomere length was determined as previously described [15]. Southern blot analysis was performed on 1 μg XhoI-digested genomic DNA hybridized with a radiolabeled poly (GT/CA) probe in wild type (JC471), *nse3-1* (JC3032), *mms21-11* (JC1981), and *smc6-9* (JC1358). In higher eukaryotes, telomeres are challenged by the continuous loss of DNA due to the end replication problem. However, in *Saccharomyces cerevisiae*, telomere length is maintained by the continued expression of telomerase, an enzyme containing a RNA subunit that serves as a template for *de novo* telomere synthesis [16]. After the 3' end is extended by telomerase, the replicative DNA polymerase fills in the complementary strand. Both telomerase extension and semiconservative replication at telomeres are included in the final events of S phase (for review see [17]). In the absence of telomerase activity, telomeres shorten extensively, leading to senescence, however a small percentage of cells survive by extending their telomeres through the HR dependent alternative lengthening of telomeres (ALT) pathway [18–21].

doi:10.1371/journal.pgen.1006268.g001

Subtelomeric heterochromatin is maintained by seemingly distinct events that are likely to be interrelated *in vivo*. For example, in budding yeast, 32 telomeres cluster together in 3–8 foci at the nuclear periphery, and this drives the sequestration of SIR complex sub-compartments within the nucleus, and promotes silencing [38]. Additionally, the SIR complex, along with Rif1 and Rif2, modulates the level of long non-coding telomeric repeat-containing RNA, TERRA, which is also an integral factor in heterochromatin formation [39–42]. TERRA levels have never been reportedly assessed in Smc5/6 compromised cells and a role for the complex in heterochromatin maintenance and transcription at telomeres remains to be clearly defined.

Here we show that the Smc5/6 complex binds telomeres, not only during late S phase when telomeres are synthesized, but also throughout the cell cycle in telomerase positive cells. Telomere clustering and full Sir4 binding is indeed dependent on the SUMO ligase activity of Mms21, however in the course of characterizing a temperature sensitive (*ts*) mutant of NSE3, telomere defects were observed in cells harboring the *nse3-1* allele, which have not been previously reported with other alleles having compromised Smc5/6 functionality. TPE and TERRA regulation, as well as telomere length defects in *nse3-1* mutants were additive with the loss of *SIR4*. In all, our data support a model that extends the functionality of Smc5/6 at telomeres beyond its previously reported roles in homology-mediated events in the ALT pathway [22–24].

Results

The Smc5/6 complex is constitutively bound to telomeres and reduced in *nse3-1* mutant cells

The Smc5/6 complex has been detected at telomeres [12, 13] and stalled and collapsed replication forks [43–48]. Given that telomeres are difficult to replicate sites and prone to fork stalling, we wanted to determine if the presence of Smc5/6 at chromosome ends coincided solely with telomere duplication or if it was present at telomeres independent of replication. We monitored Smc6^{FLAG} enrichment as a marker for the complex and performed chromatin immunoprecipitation (ChIP)–qPCR at multiple time points after cells were synchronously released from G1 into S phase. Significant enrichment of Smc6^{FLAG} was observed at three telomeres above a late-replicating control region on Chr V (Fig 1B) [49, 50], showing the Smc5/6 complex is constitutively present at telomeres and not only during the time of telomere replication in late S phase (Fig 1B).

It was recently demonstrated that Nse3 in fission yeast is important for loading the Smc5/6 complex onto chromatin [11]. We wanted to determine the involvement of Nse3 in localizing Smc5/6 to its endogenous binding sites such as telomeres in budding yeast. As with all subcomponents of the complex (Fig 1A), NSE3 is essential precluding its deletion. Therefore, we utilized a mutant allele, *nse3-1*, which contains seven amino acid substitutions and was isolated from a screen for temperature sensitivity (*ts*) at 37°C [51] (Fig 1C and 1D).

As *nse3-1* mutant cells do not synchronize efficiently with α -factor (S1A Fig), we determined Smc5/6 localization in asynchronous cultures at the semi-permissive temperature 34°C. The enrichment of Smc6^{FLAG} was significantly reduced in *nse3-1* mutant cells at telomeres and other known sites of Smc5/6 binding (Fig 1E, S1B Fig). In contrast, the level of Smc6^{FLAG} recovered at telomeres in *mms21-11* mutant cells, which are HR and SUMO ligase deficient, was similar to wild type (Fig 1E, S1B Fig). One explanation for the loss of Smc6^{FLAG} recovery is that the complex is unstable in *nse3-1* mutant cells. To address this possibility, we performed co-immunoprecipitation with two subcomponents that do not directly interact with one another, Nse6 and Smc5, as previously described [48]. In *nse3-1* mutant cells, Nse6 was recovered in Smc5 pull-downs at levels comparable to wild type cells (S1C Fig), suggesting the complex does not markedly dissociate in *nse3-1* mutants.

Telomeres were also slightly shorter in *nse3-1* mutants compared to wild type and HR-defective *smc6-9* mutant cells (Fig 1F). In contrast, slightly longer telomeres were observed in *mms21-11* mutants (Fig 1F), which is consistent with its initial characterization showing that this allele had longer telomeres [4]. The changes are indeed subtle, however there is a noticeable difference in telomere length when comparing the *nse3-1* to the other complex mutants, suggesting that the Smc5/6 complex might have a role at telomeres distinct from HR-mediated events.

The Smc5/6 complex is important for telomere clustering

Telomere clustering at the nuclear periphery in *S. cerevisiae* establishes sub-nuclear zones that sequester repressors of transcription [52, 53]. Clustering can be visualised by performing immunofluorescences and counting GFP-Rap1 foci. In haploid cells, it has been demonstrated that 32 telomeres cluster in limited number [54], and consistent with this, our quantification showed ~90% of wild type cells contained ≤ 6 foci in both G1 and S phases of the cell cycle at 34°C (Fig 2A–2C). In contrast, *nse3-1* mutants had ≥ 6 foci in ~65% and ~80% of the cells in G1 and S phases respectively, with 10–20% having ≥ 9 foci (Fig 2A–2C). In a side-by-side comparison and in line with its initial characterization, a similar clustering defect was observed in *mms21-11* mutants [4], but *smc6-9* mutant cells were similar to wild type (Fig 2D).

Defects in clustering coincide with a disruption in SIR proteins, [55, 56]. Sir4^{Myc} is expressed at similar levels in all strains (Fig 2E), and as measured by immunofluorescence, Sir4^{Myc} forms discrete punctate foci in wild type cells (Fig 2F). In contrast, Sir4^{Myc} became relatively dispersed throughout the nucleus in *nse3-1* mutant cells (Fig 2F). Dispersion was also observed in *mms21-11* and *smc6-9* alleles, but to a lesser extent than the level observed in *nse3-1* mutants (Fig 2F). Foci, albeit with reduced intensity, remained in all mutants to varying degrees, therefore as a complement to immunofluorescence and to quantify changes at telomere, we performed ChIP with Sir4^{Myc}. The level of Sir4^{Myc} recovered at telomeres in both *nse3-1* and *mms21-11* mutants was reduced to ~40% that of wild type cells (Fig 2G). In *smc6-9* mutant cells, the level of Sir4^{Myc} at telomeres was not significantly different from the amount recovered in wild type (Fig 2G). Taken together, the alleles with defects in clustering, *nse3-1* and *mms21-11*, also showed a reduction in the level of Sir4 bound at telomeres.

Sir4 sumoylation by Siz2 was previously implicated in peripheral telomere position [57, 58]. Given that our results indicated Sir4 localization to be regulated by Mms21, we investigated if the SUMO status of Sir4 itself might provide a level of regulation. Similar to *siz2Δ*, the level of Sir4 sumoylation was reduced in *mms21-11*, however SUMO levels remained similar to WT, if not higher in *nse3-1* mutants (S2 Fig). These data suggest that Sir4 localization to telomeres is not regulated by the SUMO status of Sir4 in *nse3-1* cells.

The Smc5/6 complex binding to telomeres is regulated by Sir4 and is important for TPE

To further understand the relationship between Sir4 and the Smc5/6 complex we performed co-immunoprecipitation to see if we could detect a physical interaction. Upon Smc6^{FLAG} immunoprecipitation, we recovered Sir4^{Myc} (Fig 3A). We had variable results with the reciprocal IP, however we found that Nse3^{HA} associated with Sir4^{Myc} pull downs (Fig 3B), suggesting that the Smc5/6 and SIR complexes physically associate *in vivo*.

The Smc5/6 complex influenced Sir4 recovery at telomeres and a physical interaction between the complexes was detected. Thus, the reverse was performed to determine if Sir4 levels impacted the localization of Smc5/6 at telomeres. ChIP was performed with Smc6^{FLAG} and Smc5^{FLAG} and recovery at telomeres was compared in *sir4Δ* and wild type cells (Fig 3C and 3D). The level of Smc6^{FLAG} in cells lacking *SIR4* decreased to ~60% the amount recovered in wild type cells (Fig 3C). Similarly, Smc5^{FLAG} was reduced in *sir4Δ* mutants to ~25% that of wild type levels (Fig 3D). As Smc5 and Smc6 are present at stoichiometric levels in the complex [4, 59], the greater relative change with Smc5^{FLAG} might result from IP variability. Nonetheless, there is a statistically significant decrease in both core factors of the Smc5/6 complex bound to telomeres in *sir4Δ* mutants compared to wild type cells (Fig 3C and 3D).

Sir4 is a critical factor for TPE and in the maintenance of heterochromatin near telomeres [60]. As the Smc5/6 complex interacts with Sir4, and the presence of Smc5/6 is important for

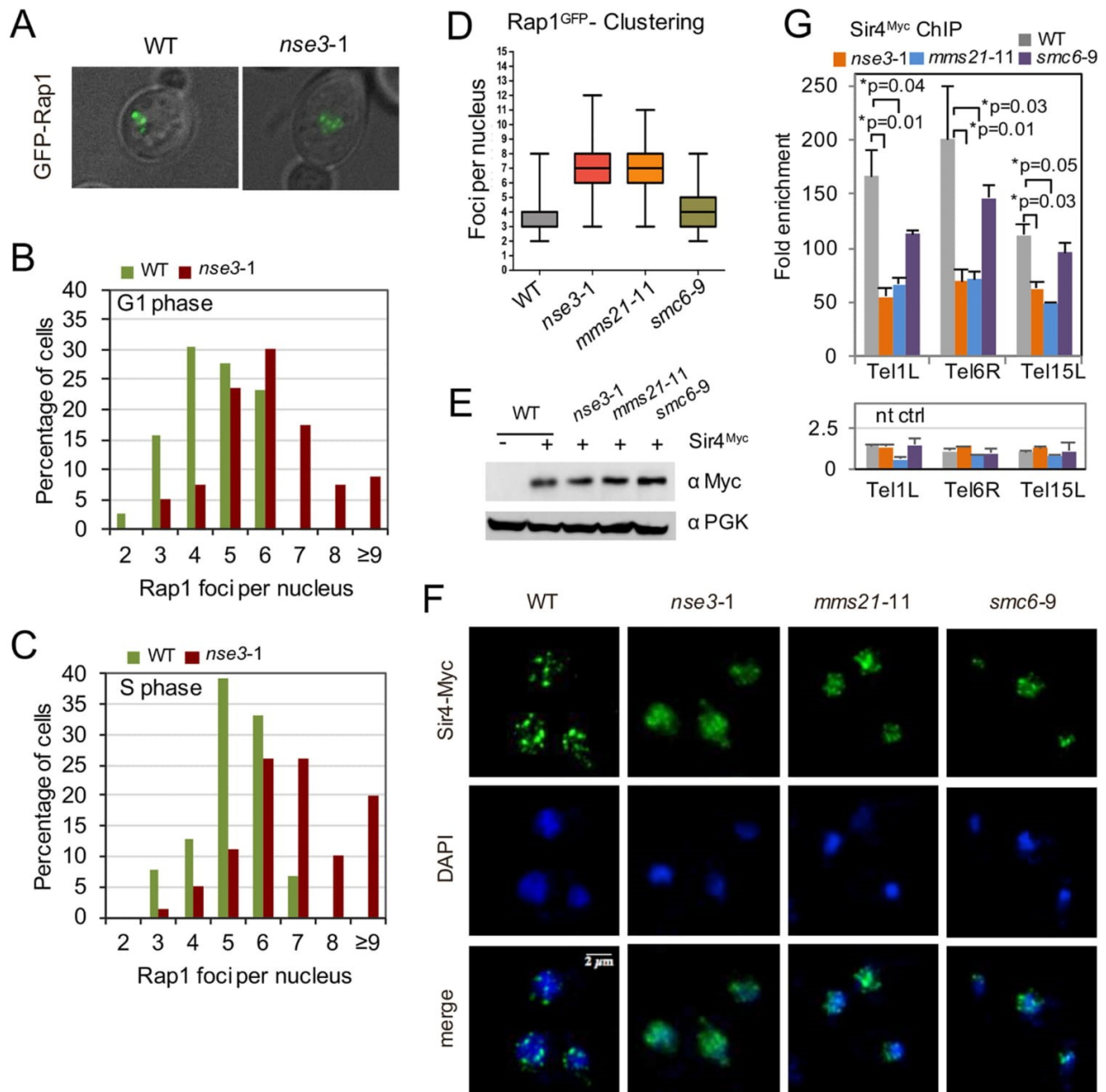


Fig 2. Smc5/6 is critical for telomere clustering and Sir4 binding to telomeres. (A) Rap1-GFP foci in WT (JC1822) and *nse3-1* (JC3041) cells counted as a measurement for telomere clustering with representative merged images of GFP and DIC channels. (B-C) The number of GFP-Rap1 foci was determined for cells within G1 (unbudded) or S (small budded cells) phases in at least 100 cells for each cell cycle stage, and (D) compared with *mms21-11* (JC1827) and *smc6-9* (JC2710). (E-F) Western blot analysis and immunofluorescence staining using α -Myc antibody (green in IF) to detect Sir4^{Myc} in WT (JC3433), *nse3-1* (JC3452), *mms21-11* (JC3597), and *smc6-9* (JC2907) cells with DAPI staining shown in blue. (G) ChIP was performed on Sir4^{Myc} as in Fig 1E from asynchronous cultures and in more than one isogenic strain if available. The fold enrichment for each strain is calculated for $n \geq 3$ experiments with the mean \pm SD at three native subtelomeres (Tel1L, Tel6R and Tel15L). The p values < 0.05 from a two-tailed t-test are indicated by (*) for wild type (JC2671 and JC3433), *nse3-1* (JC3452 and JC3849), *mms21-11* (JC3597), and *smc6-9* (JC2907 and JC3087) and non-tagged (nt) control strains included wild type (JC470), *nse3-1* (JC3607), *mms21-11* (JC1879), and *smc6-9* (JC1358).

doi:10.1371/journal.pgen.1006268.g002

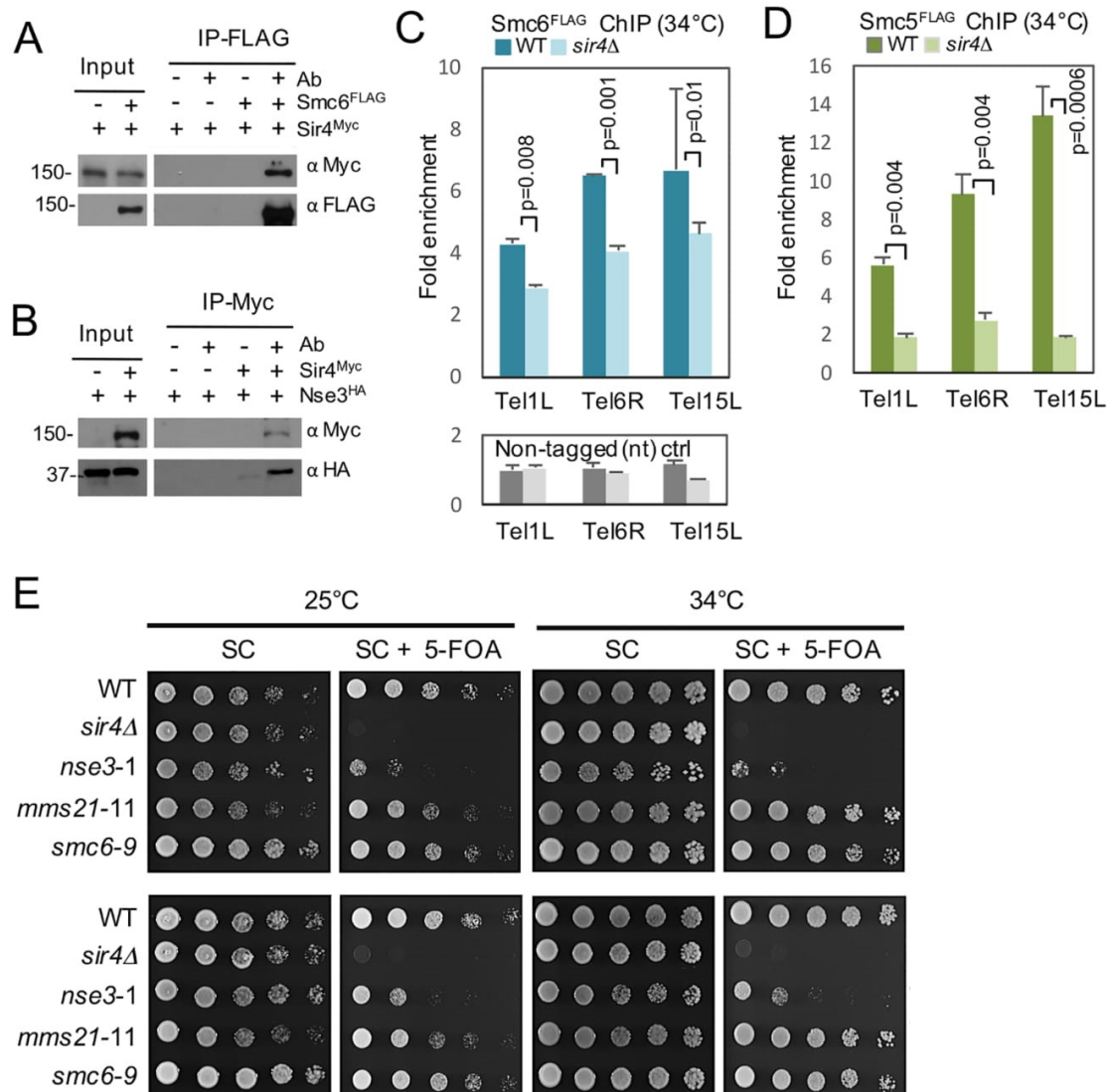


Fig 3. Smc5/6 physically associate with Sir4 and is important for TPE. (A) Co-immunoprecipitation (Co-IP) as described in the materials and methods section was performed in cells carrying *Sir4^{Myc}* and *Nse3^{HA}* (JC3736) with *Nse3^{HA}* (JC2823) as control or (B) *Sir4^{Myc}* and *Smc6^{FLAG}* (JC3853) with *Smc6^{FLAG}* (JC1594) as a control. (C) ChIP was performed on *Smc5^{FLAG}* in wild type (JC3728) and *sir4* Δ (JC3720) and (D) *Smc6^{FLAG}* in wild type (JC1594) and *sir4* Δ (JC3732) and non-tagged (nt) strains in wild type (JC470) and *sir4* Δ (JC3737) as described in Fig 1E. The fold enrichment levels are relative to the late-replicating control region on Chr V for $n \geq 3$ experiments with the mean \pm SD at three native subtelomeres (Tel1L, Tel6R and Tel15L) with p values $< .05$ from a two-tailed t-test indicated. (E) TPE was determined in strains with the *URA3* reporter at the *adh4* locus of Chromosome VIII. Tenfold (1:10) serial dilutions of overnight cultures were spotted onto SC (complete medium) and SC + .1% 5-FOA plates at 25°C and 34°C in wild type (JC1991), *sir4* Δ (JC3818), *nse3-1* (JC3860), *mms21-11* (JC1080) and *smc6-9* (JC1077) isogenic strains.

doi:10.1371/journal.pgen.1006268.g003

Sir4 recovery at telomeres and vice versa, we assessed a role for the complex in transcriptional gene silencing regulation. TPE was determined in reporter strains where *URA3* was integrated at the left arm of telomere VII [61]. Consistent with previous reports, *sir4* Δ cells showed defects in TPE as measured by their compromised ability to form colonies on medium containing

5-fluoroorotic acid (5-FOA) (Fig 3E) [60]. For *nse3-1* mutants, TPE was disrupted but not to the level observed with *sir4Δ* (Fig 3E). In contrast and consistent with previous reports, TPE in *mms21-11* and *smc6-9* mutant cells remained intact at 25°C and 34°C (Fig 3E; [4]). This data indicated that the loss of silencing in *nse3-1* mutant cells could not be solely attributed to a defect in Sir4 recruitment. This is supported by the observation that both *nse3-1* and *mms21-11* mutants showed a comparable defect of Sir4 recovery at telomeres and this was sufficient to silence the reporter transgene in the *mms21-11* allele.

The Smc5/6 complex contributes to telomere homeostasis and interacts genetically with *SIR4* and *RIF2*

To bring insight to the functionality of Smc5/6 in transcriptional silencing at telomeres the *nse3-1* allele was combined with the loss of either *SIR4* and/or *RIF2*. Utilizing the *URA3* reporter assay (Fig 4A, S3 Fig), it was difficult to observe an additive defect in silencing for *nse3-1 sir4Δ* double mutants because the loss of silencing is so penetrant with the loss of *SIR4*. Therefore, two endogenous sub-telomeric sites, *YR043C* and *CHA1*, on Tel9R and Tel3L respectively were assessed [62, 63]. Gene transcription increased in *nse3-1 sir4Δ* double mutants compared to *sir4Δ* single mutant cells (Fig 4B). Moreover, a defect in silencing was also observed in *nse3-1* mutants at *VAC17*, a gene adjacent to *CHA1* and previously determined to be silenced independently of Sir4 (Fig 4B; [63]). An additive loss of silencing was not observed when *smc6-9* was combined with *sir4Δ* (S4 Fig), suggesting that HR-regulated functions involving the Smc5/6 complex are separable from its function in transcriptional silencing. In *rif2Δ* cells, silencing remains and even increases presumably through increased binding of Sir4 to Rap1 at telomeres (Fig 4C) [30, 64]. The *nse3-1 rif2Δ* double mutants exhibited a loss of silencing that was similar to *nse3-1* single mutant cells (Fig 4C), however this was difficult to observe when measuring TPE from the *URA3* reporter unless cell concentrations were low (S3 Fig).

Rap1 binds both Sir4 and Rif1/2 [30, 32, 34, 65], and given the interactions *nse3-1* had with these factors it was important to assess Rap1 binding to telomeres in *nse3-1* mutants. By ChIP, we observed no significant difference in the level of Rap1^{Myc} bound at telomeres in *nse3-1* mutants compared to the levels in wild type cells (S5A Fig). These data also support the interpretation that the increased number of Rap1 foci we measured in *nse3-1* cells resulted from a disruption in telomere clustering rather than a disruption of Rap1 binding to telomeres (Fig 2A–2C).

Nse3 was previously reported to interact with Rif2 in a high-throughput yeast two-hybrid (Y2H) screen [66]. We verified the Rif2-Nse3 interaction and determined it was reduced when *nse3-1* was expressed (S6 Fig), however, in contrast to Sir4^{Myc}, the levels of Rif1^{Myc} and Rif2^{Myc} at telomeres in *nse3-1* were similar to wild type (Fig 4D, S5B Fig), and no significant change with Smc6^{FLAG} was measured at telomeres in cells lacking *RIF1* or *RIF2* (Fig 4E). In all, these data suggest that the physical association between Nse3 and Rif2 is not driving the recruitment of either factor/complex to telomeres.

Cells carrying the *nse3-1* allele exhibit slightly shorter telomeres (Figs 1F and 4F), which is opposite to cells lacking *RIF1* or *RIF2*, which are negative regulators of telomerase [33]. Telomere length was determined when *nse3-1* was combined with *rif1Δ* and *rif2Δ*. The *nse3-1 rif2Δ* double mutant cells exhibited a partial reversion in the telomere length phenotype (lanes 5 and 6; Fig 4F). However, when *nse3-1* was combined with *rif1Δ*, telomere length looked indistinguishable from *rif1Δ* single mutants (lanes 3 and 4; Fig 4F). These data suggest the *nse3-1* mutation does not counteract telomere elongation as a general mechanism *per se* and support the model that Rif1 and Rif2 having non-overlapping roles in telomere maintenance even though they interact with each other and with Rap1 [67–70].

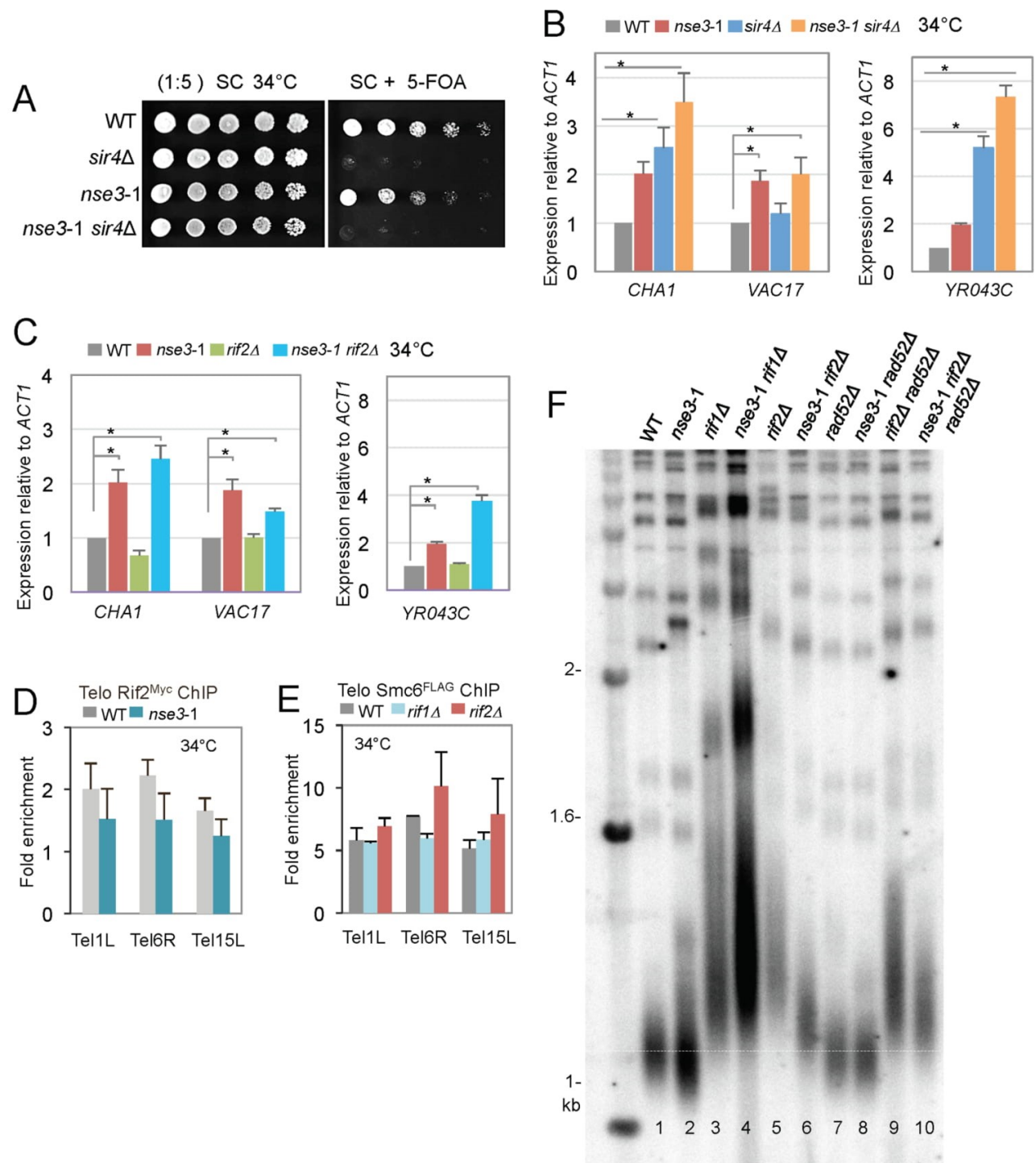


Fig 4. The *nse3-1* allele exhibits genetic interactions with the loss of *SIR4* and *RIF2*. (A) TPE was determined in strains with the *URA3* reporter at the *adh4* locus of Chromosome VIII as in Fig 3E. Overnight cultures were spotted onto SC (complete medium) and SC + .1% 5-FOA plates at 34°C in wild type (JC1991), *sir4Δ* (JC3818), *nse3-1* (JC3860), *nse3-1 sir4Δ* (JC3870) isogenic strains. (B) Transcription levels in wild type (JC470), *nse3-1* (JC3607), *sir4Δ* (JC3737), and *nse3-1 sir4Δ* (JC3741), and (C) *rif2Δ* (JC2992) and *nse3-1 rif2Δ* (JC3269) at sub-telomeric genes *CHA1* and *VAC17* on Tel3L and *YR043C* on Tel9R as described in [62, 63]. Expression values are mRNA levels relative to *ACT1* and normalization to wild type cells. Error bars represent \pm SD of $n = 3$ experiments with p values $< .05$ from a two-tailed t -test indicated by (*). (D) Chromatin immunoprecipitation (ChIP) was performed on *Rif2^{MyC}* and showed similar levels of recovery in wild type (JC2380) and *nse3-1* (JC3235) mutants. (E) ChIP on *Smc6^{FLAG}* in wild type (JC1594), *rif1Δ* (JC2754) and *rif2Δ* (JC3074) cells with enrichment levels for untagged strains in wild type and mutants shown in S5C and S5D Fig. The mean \pm SD of the fold enrichment at three native subtelomeres (Tel1L, Tel6R and Tel15L) relative to the control (ctrl) late replicating region on Chromosome V (469104–469177) is reported. In *rif2Δ* mutants the p values $< .05 = 0.53$ (Tel1L), 0.13 (Tel6R), and 0.15 (Tel15L) indicated that the difference was not significant from wild type. (F) Telomere length was determined as previously described [15]. Southern blot analysis was performed on 1 μ g *XhoI*-digested genomic DNA hybridized with a radiolabeled poly (GT/CA) probe in wild type (JC470), *nse3-1* (JC3607), *rif1Δ* (JC3448), *nse3-1 rif1Δ* (JC3623), *rif2Δ* (JC2992), *nse3-1 rif2Δ* (JC3269), *rad52Δ* (JC1427), *nse3-1 rad52Δ* (JC3629), *rif2Δ rad52Δ* (JC3603), and *nse3-1 rad52Δ rif2Δ* (JC3627) strains.

doi:10.1371/journal.pgen.1006268.g004

As the Smc5/6 complex is implicated in HR and the ALT pathway, we also investigated if the partial reversion of long telomeres in *nse3-1 rif2Δ* was regulated by HR events. Upon disruption of *RAD52*, no detectable changes were observed, as telomeres for *nse3-1 rad52Δ* and *nse3-1 rif2Δ rad52Δ* mutants were similar in size to *nse3-1* and *nse3-1 rif2Δ* mutants respectively (lanes 2 and 8; lanes 6 and 10; Fig 4F). Moreover, telomere shortening was not observed when the loss of *RIF2* was combined with the HR-deficient *smc6-9* allele (S7 Fig). Taken together, these data provide additional support for Smc5/6 having a role at telomeres distinct of its functionality in HR-mediate events.

TERRA regulation is altered in *nse3-1* mutants

In addition to the transcription of gene-coding regions, RNA polymerase II also transcribes TERRA at telomeres [40]. There are reported correlations between non-physiological increases and decreases in TERRA levels with telomeric abnormalities [39, 71]. Moreover, TERRA expression was previously demonstrated to be regulated by Rap1, the SIR complex, and Rif1/2 proteins, with the role of Rif2 being minimal and only at a subset of telomeres [42]. As the *nse3-1* mutation results in a loss of silencing at subtelomeric genes and showed interactions with Rif2 and Sir4 we measured TERRA expression in cell carrying the *nse3-1* allele.

Compared to wild type, there was a significant de-repression in TERRA expressed from both X only and Y' telomeres in *nse3-1* mutants at both 28°C and 34°C (red, Fig 5A and 5B, S8 Fig). Consistent with previous reports [42], *sir4Δ* mutants showed substantial TERRA expression from X only telomeres (purple, Fig 5A and 5B), and we observed no distinguishable increase in TERRA levels in cells lacking *RIF2* at TEL1R, 6R, or Y' (aqua, Fig 5A and 5B, S8 Fig). TERRA levels in *nse3-1* and *nse3-1 rif2Δ* were similar and significantly higher than the level measured in *rif2Δ* mutant cells (red, green, and aqua; Figs 5A and 5B and S8). Interestingly, and consistent with the TPE reporter assay, TERRA levels in *sir4Δ rif2Δ* cells (light grey) were silenced to levels not statistically different from wild type (dark grey), and similar to *rif2Δ* (aqua, Fig 5A and 5B). There was a 2- and 4- fold increase in the level of TERRA from Y' and X-only telomeres respectively in *nse3-1 sir4Δ* cells (blue) compared to cells lacking *SIR4* (purple) at 28°C (Fig 5A, S8A Fig). The same trend was observed at 34°C, however variability between experiments resulted in p values > 0.05 (Fig 5B, S8B Fig).

Both *nse3-1* and *sir4Δ* mutants have slightly shorter telomeres (Figs 1F and 5C) [53]. As well, transcription and TERRA levels increased in *nse3-1* and these phenotypes were additive with *sir4Δ*. Given the correlations between increased TERRA levels and induced transcription with telomere shortening [40, 72] we proceeded to assess telomere length in *nse3-1 sir4Δ* double mutants. Telomeres shorten further in double mutants compared to cells harboring either *nse3-1* or *sir4Δ* single mutant alone (Fig 5C). Highlighting the difference again between *nse3-1*

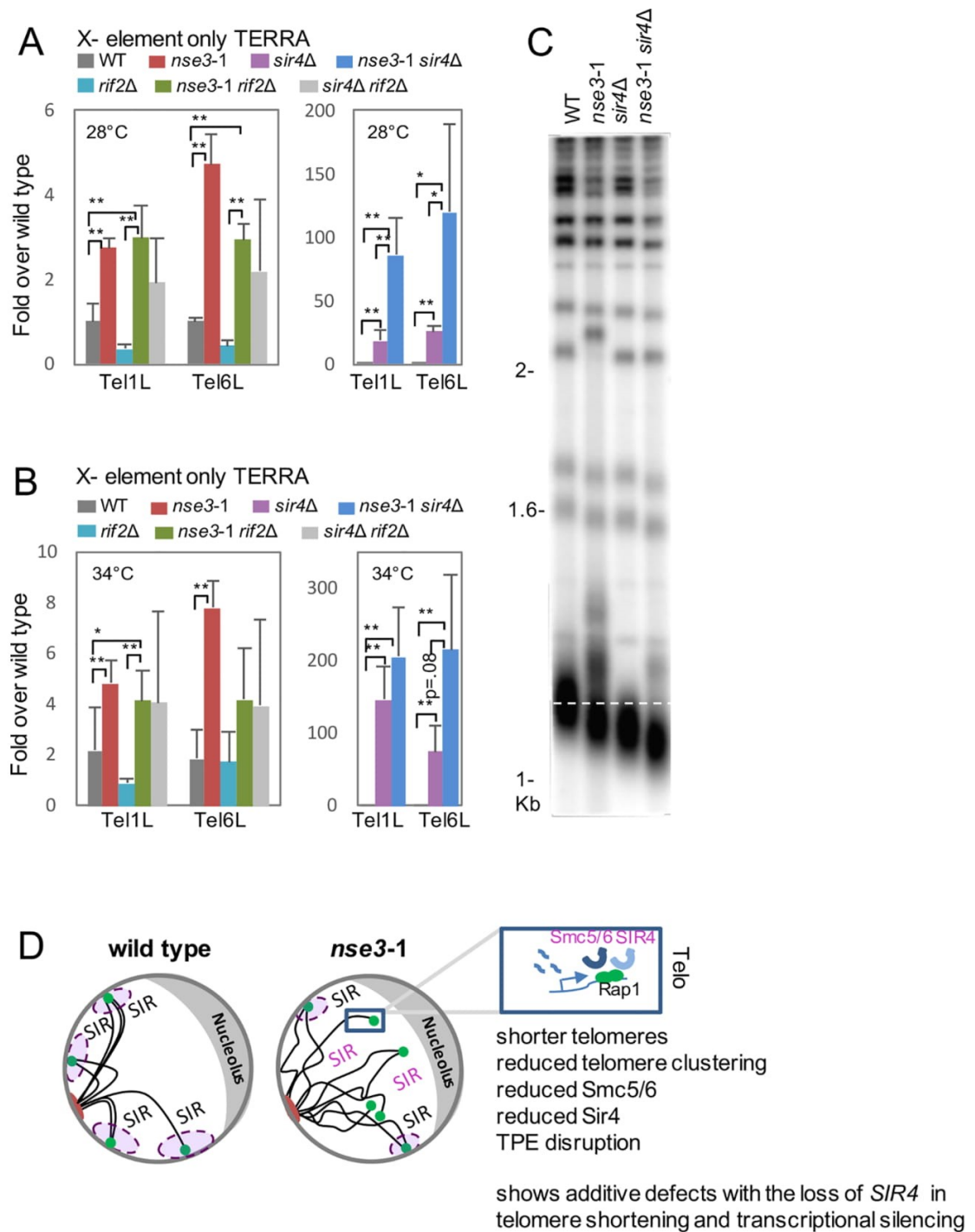


Fig 5. Increases in TERRA and telomere shortening are additive in *nse3-1 sir4Δ* double mutant cells. (A and B) TERRA expression was determined by RT-qPCR for Tel1R and Tel6R, X only telomeres, at 28°C and 34°C in wild type (JC470), *nse3-1* (JC3607), *rif2Δ* (JC2992), *nse3-1 rif2Δ* (JC3269), *sir4Δ* (JC3737), *nse3-1 sir4Δ* (JC3741), and *sir4Δ rif2Δ* (JC3738). TERRA expression

from Y' telomeres is shown in S8 Fig. Statistical significance with p values < .05 (*) or < .01 (**) are reported from a two-tailed *t*-test. (C) Telomere length was determined as in Fig 1F by Southern blot analysis on 1 µg XhoI-digested genomic DNA hybridized with a radiolabeled poly (GT/CA) probe in wild type (JC470), *nse3-1* (JC3607), *sir4Δ* (JC3737), and *nse3-1 sir4Δ* (JC3741). (D) A model comparing telomere organization in wild type and *nse3-1* mutants. The Smc5/6 complex localizes to telomeres but significantly decreases in *nse3-1* mutants (Fig 1E). Moreover, *nse3-1* alleles exhibit shorter telomeres, reduced telomere clustering, reduced Sir4 binding and defects in TPE. When *nse3-1* is combined with the loss of *SIR4*, the resulting double mutant cells show additive defects in transcriptional repression and telomere shortening.

doi:10.1371/journal.pgen.1006268.g005

and *smc6-9*, the level of TERRA expression was not additive in *smc6-9 sir4Δ* double mutant cells (S9A and S9B Fig) and in contrast to *nse3-1*, telomere length in *smc6-9* did not result in additive shortening when combined with *sir4Δ*. (S9C Fig). Taken together, our data support a model whereby Smc5/6 has a role in transcriptional silencing and telomere length maintenance that is different from its involvement in HR dependent events at telomeres and underscore the value of characterizing various *ts* alleles of the complex.

Discussion

We report a previously uncharacterized function for the Smc5/6 complex with links to transcriptional silencing and demonstrate a role for the complex in telomere homeostasis. In cells carrying the *nse3-1* allele, Smc5/6 complex levels are markedly reduced at telomeres. This was true for cells grown at 25°C or 34°C, the temperature we used in many of our measurements, indicating that higher temperature did not introduce confounding defects to the complex in this mutant background (S10 Fig). Utilizing *nse3-1*, we show that Smc5/6 is critical for 1. Maintaining proper telomere length, 2. Telomere clustering, 3. SIR complex recovery at telomeres, 4. TPE, and 5. Regulating TERRA levels.

Telomere defects involving mutations in the Smc5/6 complex were first reported with the *mms21-11* allele; however, the loss of SUMO ligase activity did not appear to impact TPE, as expression from a *URA3* reporter construct integrated at Tel5R remained silent [4]. Upon characterization of the *nse3-1* allele, we also observed a loss of clustering, but unlike *mms21-11*, TPE was disrupted as shown by an increase in expression of sub-telomeric genes and *URA3* reporter expression. Further characterization of *nse3-1* and *mms21-11* alleles demonstrated that a decrease in Sir4 binding at telomeres was common to both alleles (a summary of phenotypes can be found in S3 Table). In agreement with previous reports (Zhao & Blobel, 2005), and in side-by-side comparison with *nse3-1* and wild type, we find silencing at sub-telomeres remained intact for *mms21-11* and *smc6-9* mutants (Fig 3E), suggesting that the partial reduction in Sir4 at telomeres in *mms21-11* and *nse3-1* mutants was not sufficient to abrogate silencing. These data also raise the possibility that the complex might have additional functions, which are disrupted in *nse3-1*, that are important for silencing. Our data also suggest a partial interdependency between the Smc5/6 complex and Sir proteins at telomeres. Indeed, a physical interaction is detected between the Smc5/6 complex and Sir4 (Fig 3A and 3B) and in the absence of *SIR4* there is a moderate but statistically significant ~30% reduction in the levels of Smc6^{FLAG} recovered at telomeres, however for comparison, Smc6^{FLAG} was reduced further in *nse3-1* mutant cells by ~60% the levels of wild type (S10B Fig). Even though Smc5/6 and Sir4 contribute to the stability of one another at telomeres, the defects in TPE and TERRA expression associated with the loss of Smc5/6 at telomeres are additive with the loss of *SIR4*.

Live-cell imaging at the single-cell level demonstrated that when telomeres become critically short, TERRA is transcribed, and this recruits telomerase to the TERRA-expressing telomere to promote elongation [73]. Increased TERRA levels above physiologically important levels likely have an inhibitory affect on telomere length maintenance. TERRA levels in *nse3-1* mutants are above wild type and when combined with *sir4Δ*, the double mutants show an even greater

increase in TERRA compared to the levels measured in cells lacking *SIR4* only. The elevated transcription and loss of TPE in *nse3-1* is likely to have a direct effect on TERRA expression and supports the model that Smc5/6 functionality is important for silencing, and when deregulated, transcription lead to increases in TERRA and telomere loss [74]. Telomere shortening is additive in *nse3-1 sir4Δ* mutants. The robust expression of TERRA in *nse3-1 sir4Δ* cells possibly reinforces the shortening of telomeres, and vice versa. Indeed this explanation is consistent with previous work showing that when TERRA increases, telomeres shorten via telomerase inhibition [40], as well as disrupting the inhibitory effect of γKu70/80 on Exonuclease 1, leading to its increased activity at telomeres [75]. A more speculative model, that will require additional investigation, is that increases in TERRA expression might lead to increased RNA-DNA hybrids at telomeres and subsequently more aberrant replication fork structures that fail to be resolved by Smc5/6, and this results in telomere loss specifically in alleles deficient in silencing, as in *nse3-1* and *nse3-1 sir4Δ* mutant cells. Lastly, an alternative model that we cannot exclude is that there is a more direct effect of *nse3-1* on telomere length independent of TERRA, which might involve interactions of the Nse1-Nse3-Nse4 sub-complex within Smc5/6 that become altered in cells carrying the *nse3-1* allele.

We also assessed the SUMO status of Sir4 and determined that sumoylation was reduced in *mms21-11* mutant cells to levels similar to those previously observed in cells lacking *SIZ2* (S2 Fig) [57]. However, Sir4 sumoylation remained, and was slightly higher in cells harbouring the *nse3-1* allele when silencing is reduced. This is consistent with previous work showing that increased levels of Siz2, and by extension elevated sumoylation, function antagonistically to silencing [58], and also suggests there is no direct correlation between Sir4 sumoylation in telomere clustering at the periphery. These data are also consistent with the observation that a SUMO-Sir4 fusion construct could not restore anchoring in *siz2Δ* mutants, which suggested that sumoylation of another target, besides Sir4, is important for telomere positioning at the periphery [57].

Telomere clustering and silencing are distinguishable functions [76, 77]. Our data indicates that Smc5/6 likely contributes to both and independently of HR as *smc6-9* was not distinguishable from wild type in all measures, and that Mms21 sumoylation is important for clustering, but not silencing. Determining the role of Smc5/6 in clustering at the periphery will require further investigation. Organization of telomeres at the periphery is driven by partially redundant pathways involving Sir4 binding to membrane bound Esc1 and Yku70/80 [76, 78]. First, although Sir4 sumoylation does not control clustering we have not assessed if Esc1, which is also a target of sumoylation, regulates clustering in a pathway dependent on Mms21 activity [79, 80]. Secondly, unlike Sir4, we observed that the level of YKu70 at telomeres in *nse3-1* mutant cells was not statistically different from wild type cells (S11 Fig). However, determining if Mms21 dependent sumoylation of γKu70 at telomeres is critical for Smc5/6 mediated anchoring will provide an additional level of understanding as both Yku70 and Yku80 sumoylation are important for perinuclear positioning [57], and while Yku80 sumoylation is markedly reduced in *siz2Δ* mutants, Yku70-sumoylation is primarily dependent on Mms21 [4, 57]. Our data support a model where the Smc5/6 complex, like other proteins involved in DNA repair, such as Tel1 and Mre11, contributes to transcriptional silencing via two pathways, one involving direct interactions with SIR factors and the other regulating nuclear position and association with the periphery [81].

The current study demonstrates a role for Smc5/6 complex in telomere maintenance that is distinct from its previously characterized functions in replication and HR. Our data show that the Smc5/6 complex is a *bona fide* telomere-binding factor that has reduced recovery in *nse3-1* mutant cells (Fig 5D). Our study establishes Smc5/6 as having a physiological role in the structural maintenance of chromosome ends where its localization and integrity contribute to the

stabilization of factors with well-established roles in telomere maintenance and metabolism. Consistent with a role in end protection, the localization of Smc5/6 to telomeres is critical for telomere clustering and transcriptional repression (Fig 5D). These roles for Smc5/6 together its involvement in the various aspects of HR-mediated DNA metabolism, such as replication and repair, perhaps contribute to the essential requirement of this complex for cell survival.

Materials and Methods

Yeast strains and plasmids

All strains used in this study are listed in S1 Table. The *nse3-1* mutant was a kind gift from Dr. P. Hieter at Michael Smith Laboratories. In all experiments exponentially growing cells were incubated at 34°C for 2 hrs before harvesting, unless indicated otherwise. Drop assays were performed by growing cells overnight, and then performing 10-fold serial dilutions where 4μl of each dilution were plated on YPAD and incubated at the indicated temperature. For repression assays, 5-fold or 10-fold dilutions from overnight cultures were plated on SC or SC + 5-FOA as described [76, 82] at the indicated temperatures.

Chromatin immunoprecipitation (ChIP)

ChIP experiments performed as described previously [83], except that cells were incubated at 34°C for 2 hours before crosslinking with formaldehyde in media where the temperature was held at 25°C to allow efficient crosslinking. Immunoprecipitates were washed once with lysis buffer (50 mM HEPES, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1 mM PMSF and protease inhibitor pellet (Roche)) and twice with wash buffer (100 mM Tris (pH 8), 0.5% Nonidet P-40, 1 mM EDTA, 500 mM NaCl, 250 mM LiCl, 1 mM PMSF and protease inhibitor pellet (Roche)). Real-time qPCR reactions were carried out using SYBR green method. Results shown as fold enrichment at three native subtelomeres (Tel1L, Tel6R and Tel15L) compared to a control (ctrl) late replicating region on Chromosome V (469104–469177) [49, 50]. Primer sequences are listed in S2 Table.

Microscopy

For Rap1-GFP foci imaging, cells were grown to the 5×10^6 cells/ml at 34°C for 2 hours in synthetic complete (SC) media. Images were captured immediately in 21 Z-stacks of 0.2 μm using Zeiss Axiovert 200 microscope. GFP foci per nucleus were manually counted as a representation for telomere foci. For Sir4 immunofluorescence, cell cultures were grown to the 5×10^6 cells/ml at 34°C for 2 hours in synthetic complete (SC) media. Cells were immediately fixed using 3.7% formaldehyde and spheroplasted in SK (0.1M KPO₄/1.2M sorbitol) buffer containing 0.4 mg/ml Zymolase (US, Biological). Spheroplasted cells were fixed on poly-lysine coated coverslips as described previously [84]. Coverslips were blocked in 1% BSA in PBS for 1 hour, then incubated with primary (αMyc, ab9106-100) followed by secondary (Alexa 488; Molecular Probes, Invitrogen) antibodies each for 30 minutes. Coverslips were mounted on microscope slides using vectashield-containing DAPI (Molecular Probes, Invitrogen). Images were taken in 21 Z-stacks of 0.2 μm using Zeiss Axiovert 200 microscope and Z-stack images were flattened and presented in the figures. ImageJ (NIH, USA) was used for adjusting background in both live and immunofluorescence imaging methods.

Co-immunoprecipitation assay

Strains carrying HA-tagged Nse6 and Myc-tagged Smc5 were grown to the log phase at room temperature and then incubated for 2 hours at 34°C in YPAD media. Cells were lysed with

zirconia beads in lysis buffer (50 mM HEPES, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1 mM PMSF and protease inhibitor pellet (Roche)). Cell lysates were incubated with α Myc antibody-coupled Dynabeads (Invitrogen) for 2 hours at 4°C. Immunoprecipitates were washed once with lysis buffer and twice with wash buffer (100 mM Tris (pH 8), 0.5% Nonidet P-40, 1 mM EDTA, and 400 mM NaCl, 1 mM PMSF and protease inhibitor pellet (Roche)), each for 5 minutes. Beads were resuspended in SDS loading buffer and subjected to SDS gel electrophoresis followed by western blotting by α HA (Santa Cruz, F7) and α Myc (9E10) antibodies. The same procedure was performed for Sir4-Nse3 except that lysates were clarified with one round of centrifugation at 13200 rpm before incubating with Myc antibody-coupled beads and immunoprecipitates were washed once with lysis buffer and twice with wash buffer (100 mM Tris (pH 8), 0.5% Nonidet P-40, 1 mM EDTA, and 250 mM LiCl, 1 mM PMSF and protease inhibitor pellet (Roche)). The co-IP between Sir4 and Smc6 was performed in stationary phase cultures without a chromatin spin and with a wash buffer containing 250 mM NaCl rather than 250 mM LiCl.

Telomere length analysis by Southern blotting

Measurement of telomere length was performed as described in [15]. Cells were grown for 48 hours to stationary phase in liquid YPAD at 34°C and harvested for Southern blotting. Genomic DNA from each strain were digested with *XhoI* and then separated by 1% agarose gel electrophoresis. Denatured DNA was transferred to Amersham Hybond-XL (GE Healthcare Life Sciences) membrane and hybridized with radiolabeled telomeric repeat probe (TG₁₋₃/C₁₋₃A). Rediprime II DNA Labeling System used to radiolabel telomeric probe (GE).

Gene expression analysis

Exponentially growing WT and *nse3-1* cells were incubated for 2 hours at 34°C prior to harvesting by centrifugation and snap freezing in liquid nitrogen. Cells were lysed and mRNA isolation was followed by reverse transcription. Complementary DNA (cDNA) was amplified and quantified using the SYBR Green qPCR method. Primers are listed in S2 Table. Fold gene expression represents real time qPCR values relative to WT samples. Gene expression values were normalized to *ACT1* expression as the internal control.

RNA Extraction and RT-qPCR for TERRA expression analyses

Total RNA was extracted as in [73]. 2 μ g of RNA was treated with 4U of DNase I (Thermo-Fisher) for 4 hr at 37°C and then purified by phenol/chloroform extraction. 1 μ g of DNase-treated RNA was reverse transcribed by using RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Fisher) at 42°C for 1 hr. 0.5 μ mol of a C-rich primer (CACCACACCCACACACCCACCCACA) and 0.5 μ g of a poly(dT) primer was used for the reverse transcription reaction (RT). 20ng of cDNA was used for the qPCR, which was performed using the qPCR master mix SsoFAST EvaGreen Supermix from Bio-Rad. qPCR was carried out on a Roche LightCycler96. TERRA expression was normalized against *ACT1* mRNA expression using the delta Ct method and then normalized against the WT yeast strain.

Supporting Information

S1 Table. Strains used in this study.

(PDF)

S2 Table. qPCR primers used in this study.

(PDF)

S3 Table. Summary of mutant phenotypes.

(PDF)

S1 Fig. The *nse3-1* mutants do not synchronize properly, however components of the Smc5/6 complex still interact.

(A) Flow cytometry was performed as described in Fig 1. (B) The fold enrichment levels are relative to the late-replicating control region on Chr V for $n = 3$ experiments with the mean \pm SD at the silent mating type locus (*HMR*) and two regions in the rDNA (*NTS1*) and (*NTS2*) [12]. All primers are listed in S2 Table. (C) Co-immunoprecipitation assay was performed by immunoprecipitating Smc5^{Myc} using α -Myc antibody in WT (JC2229), *nse3-1* (JC2677) and *smc6-9* (JC2232) cells. Beads were washed in 400mM NaCl, followed by western blotting for Smc5^{Myc} and Nse6^{Ha} components.

(TIFF)

S2 Fig. Sir4 Sumoylation in mutant backgrounds. Sumoylated proteins were isolated by Ni-NTA affinity purification of His-Smt3 as described previously [48, 57, 80, 85] followed by western blotting with α Myc antibodies to visualize sumoylated proteins in cells containing Myc-tagged Sir4 with un-tagged Smt3 wild type (JC3433), or His8-tagged Smt3 in wild type (JC3823), *siz2Δ* (JC3822) *nse5-ts1* (JC3851) and *mms21-11* (JC3824).

(TIFF)

S3 Fig. TPE measurements from the *URA3* reporter at Telomere VII L. TPE was determined in strains with the *URA3* reporter at the *adh4* locus of Chromosome VIII. Overnight cultures were spotted onto SC (complete medium) and SC + .1% 5-FOA plates and photographed after incubation at 25C and 34C in wild type (JC1991), *sir4Δ* (JC3818), *nse3-1* (JC3860), *nse3-1 sir4Δ* (JC3870), *rif2Δ* (JC3852), *sir4Δ rif2Δ* (JC3872), *nse3-1 rif2Δ* (JC3861), *nse3-1 rif2Δ sir4Δ* (JC3871) isogenic strains.

(TIFF)

S4 Fig. Transcription at sub-telomeric genes in *smc6-9* mutants. Levels of transcription were compared at sub-telomeric genes *CHA1*, *VAC17* and *YR043C* as described in Fig 4 in wild type (JC470), *sir4Δ* (JC3737), *smc6-9* (JC3039), and *sir4Δ smc6-9* (JC3925). Expression values are mRNA levels relative to *ACT1* and normalization to wild type cells. Error bars represent \pm SD of $n = 3$ experiments.

(TIFF)

S5 Fig. ChIP performed on Rap1^{Myc} and Rif1^{Myc} and in non-tagged (nt) strains. ChIP was performed with Chromatin immunoprecipitation (ChIP) was performed on (A) Rap1^{Myc} in wild type (JC2381) and *nse3-1* (JC3272), (B) Rif1^{Myc} in wild type (JC3277) and *nse3-1* (JC3295), (C) α Myc in non-tagged wild type (JC470) and *nse3-1* (JC3607) cells and (D) α FLAG in non-tagged wild type (JC470), *rif1Δ* (JC3448), and *rif2Δ* (JC2992) cells. The mean \pm SD of the fold enrichment at three native subtelomeres (Tel1L, Tel6R and Tel15L) are normalized to the negative ctrl region described in Fig 1F. No statistically significant differences were calculated after a two-tailed *t*-test for Rap1^{Myc} ChIP between wild type and *nse3-1*, the *p* values $< .05 = 0.47$ (Tel1), 0.28 (Tel6R), and 0.35 (Tel15L), or for Rif1^{Myc}.

(TIFF)

S6 Fig. Rif1, Rif2 and Smc6 recruitment at native telomeres in various mutant cells. (A) Yeast-two Hybrid analysis was performed as previously described [48]. *NSE3* full-length, *nse3* (1–150)—N-terminal end, *nse3*^(150–300)—C-terminal end, or the *nse3-1* mutant were cloned into bait plasmid (pEG202) and *RIF2* into prey plasmid (pJG4-6) [86]. Plasmids containing bait and prey along with pSH18034 (LacZ reporter plasmid) were transformed into JC1280 and grown overnight in selective media containing 2% raffinose. Overnight cultures were then

divided and growth continued in either 2% galactose or 2% glucose for 6 hours at 30°C. β -galactosidase activity was then measured in permeabilized cells as previously described [48, 87]. (B) Western blots with a-HA and a-LexA shows the expression levels of Rif2^{HA}, Nse3^{LexA} full-length, N (Nse3^(1–150)), C-terminal Nse3^(150–300) and Nse3-1 peptides from Y2H vectors (TIFF)

S7 Fig. The *nse3-1* allele, but not the *smc6-9* allele shortens the long telomeres in cells lacking *RIF2*. Telomere length is determined for the indicated strains by performing southern blot analysis using radiolabeled poly GT/CA probe as explained in Fig 1F and in the experimental procedures section for wild type (JC470), *rif2Δ* (JC2992), *smc6-9* (JC3039), and *smc6-9 rif2Δ* (JC-2993). (TIFF)

S8 Fig. TERRA expression levels in *rif2Δ* and *nse3-1* mutants. (A and B) TERRA expression was determined for Y' at 28°C and 34°C in wild type (JC470), *nse3-1* (JC3607), *rif2Δ* (JC2992), *nse3-1 rif2Δ* (JC3269), *sir4Δ* (JC3737), *nse3-1 sir4Δ* (JC3741), and *sir4Δ rif2Δ* (JC3738). Statistical significance with p values < .05 (*) or < .01 (**) are reported from a two-tailed *t*-test. The Y' primers detect TERRA expressed from these telomeres: 8L / 8R / 12L-YP1 / 12R-YP2 / 13L / 15R. The arms of chromosome XII contains two short telomeric Y' elements, YP1 is more end-proximal and YP2 is more centromere-proximal [75]. (TIFF)

S9 Fig. TERRA expression and telomeres length in *smc6-9* mutants. (A and B) TERRA expression was determined by RT-qPCR for Tel1R and Tel6R, X only telomeres, at 28°C (A) and 34°C (B). Statistical significance with p values < .05 (*) or < .01 (**) are reported from a two-tailed *t*-test. (C) Telomere length was determined as in Fig 1F by Southern blot analysis on 1μg XhoI-digested genomic DNA hybridized with a radiolabeled poly (GT/CA) probe in wild type (JC470), *sir4Δ* (JC3737), *smc6-9* (JC3039), and *smc6-9 sir4Δ* (JC3925). (TIFF)

S10 Fig. Comparison of ChIP levels for Smc6 at telomeres in *sir4Δ* and *nse3-1* mutants and wild type cells. (A) Chromatin immunoprecipitation (ChIP) on Smc6^{FLAG} in wild type (JC1594) and *nse3-1* (JC2630) at 25°C. (B) ChIP comparison of Smc6^{FLAG} in wild type (JC1594), *sir4Δ* (JC3732), *nse3-1* (JC2630). The enrichment at three native subtelomeres (Tel1L, Tel6R and Tel15L) normalized to the negative control region as described in Fig 1B. The levels of Smc6 are reduced further in *nse3-1* mutants than *sir4Δ* mutants. (TIFF)

S11 Fig. ChIP of yKu70 at telomeres in *nse3-1* mutant and wild type cells. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) was performed on yKu70^{Myc} in wild type (JC1352) and *nse3-1* (JC3392). The enrichment at three native subtelomeres (Tel1L, Tel6R and Tel15L) normalized to the negative control region as described in Fig 1B. (TIFF)

Acknowledgments

We would like to thank Drs. Charlie Boone, Susan Gasser, Philip Hieter, David Shore, Virginia Zakian, and Xiaolan Zhao for strains. We thank all members of the Cobb Lab for helpful discussions.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SMF PC JC.

Performed the experiments: SMF JS MTE ML EC.

Analyzed the data: SMF PC JC.

Contributed reagents/materials/analysis tools: PC JC.

Wrote the paper: SMF JC.

References

1. Nasmyth K, Haering CH. The structure and function of SMC and kleisin complexes. *Annu Rev Biochem.* 2005; 74:595–648. doi: [10.1146/annurev.biochem.74.082803.133219](https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.082803.133219) PMID: [15952899](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15952899/).
2. Hirano T. At the heart of the chromosome: SMC proteins in action. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006; 7(5):311–22. doi: [10.1038/nrm1909](https://doi.org/10.1038/nrm1909) PMID: [16633335](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16633335/).
3. Jeppsson K, Kanno T, Shirahige K, Sjogren C. The maintenance of chromosome structure: positioning and functioning of SMC complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014; 15(9):601–14. doi: [10.1038/nrm3857](https://doi.org/10.1038/nrm3857) PMID: [25145851](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25145851/).
4. Zhao X, Blobel G. A SUMO ligase is part of a nuclear multiprotein complex that affects DNA repair and chromosomal organization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102(13):4777–82. doi: [10.1073/pnas.0500537102](https://doi.org/10.1073/pnas.0500537102) PMID: [15738391](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15738391/); PubMed Central PMCID: [PMC555716](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC555716/).
5. Potts PR, Yu H. Human MMS21/NSE2 is a SUMO ligase required for DNA repair. *Mol Cell Biol.* 2005; 25(16):7021–32. doi: [10.1128/MCB.25.16.7021-7032.2005](https://doi.org/10.1128/MCB.25.16.7021-7032.2005) PMID: [16055714](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16055714/); PubMed Central PMCID: [PMC1190242](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1190242/).
6. Andrews EA, Palecek J, Sergeant J, Taylor E, Lehmann AR, Watts FZ. Nse2, a component of the Smc5-6 complex, is a SUMO ligase required for the response to DNA damage. *Mol Cell Biol.* 2005; 25(1):185–96. doi: [10.1128/MCB.25.1.185-196.2005](https://doi.org/10.1128/MCB.25.1.185-196.2005) PMID: [15601841](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15601841/); PubMed Central PMCID: [PMC538766](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC538766/).
7. Pebernard S, McDonald WH, Pavlova Y, Yates JR, 3rd, Boddy MN. Nse1, Nse2, and a novel subunit of the Smc5-Smc6 complex, Nse3, play a crucial role in meiosis. *Mol Biol Cell.* 2004; 15(11):4866–76. doi: [10.1091/mbc.E04-05-0436](https://doi.org/10.1091/mbc.E04-05-0436) PMID: [15331764](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15331764/); PubMed Central PMCID: [PMC524734](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC524734/).
8. Palecek J, Vidot S, Feng M, Doherty AJ, Lehmann AR. The Smc5-Smc6 DNA repair complex. bridging of the Smc5-Smc6 heads by the KLEISIN, Nse4, and non-Kleisin subunits. *J Biol Chem.* 2006; 281(48):36952–9. doi: [10.1074/jbc.M608004200](https://doi.org/10.1074/jbc.M608004200) PMID: [17005570](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17005570/).
9. Pebernard S, Perry JJ, Tainer JA, Boddy MN. Nse1 RING-like domain supports functions of the Smc5-Smc6 holocomplex in genome stability. *Mol Biol Cell.* 2008; 19(10):4099–109. doi: [10.1091/mbc.E08-02-0226](https://doi.org/10.1091/mbc.E08-02-0226) PMID: [18667531](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18667531/); PubMed Central PMCID: [PMC2555936](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2555936/).
10. Doyle JM, Gao J, Wang J, Yang M, Potts PR. MAGE-RING protein complexes comprise a family of E3 ubiquitin ligases. *Mol Cell.* 2010; 39(6):963–74. doi: [10.1016/j.molcel.2010.08.029](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.08.029) PMID: [20864041](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20864041/); PubMed Central PMCID: [PMC4509788](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4509788/).
11. Zabradý K, Adamus M, Vondrova L, Liao C, Skoupilova H, Novakova M, et al. Chromatin association of the SMC5/6 complex is dependent on binding of its NSE3 subunit to DNA. *Nucleic Acids Res.* 2015. doi: [10.1093/nar/gkv1021](https://doi.org/10.1093/nar/gkv1021) PMID: [26446992](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26446992/).
12. Torres-Rosell J, Machin F, Farmer S, Jarmuz A, Eydman T, Dalgaard JZ, et al. SMC5 and SMC6 genes are required for the segregation of repetitive chromosome regions. *Nat Cell Biol.* 2005; 7(4):412–9. doi: [10.1038/ncb1239](https://doi.org/10.1038/ncb1239) PMID: [15793567](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15793567/).
13. Lindroos HB, Strom L, Itoh T, Katou Y, Shirahige K, Sjogren C. Chromosomal association of the Smc5/6 complex reveals that it functions in differently regulated pathways. *Mol Cell.* 2006; 22(6):755–67. doi: [10.1016/j.molcel.2006.05.014](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.05.014) PMID: [16793545](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16793545/).
14. Murray JM, Carr AM. Smc5/6: a link between DNA repair and unidirectional replication? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008; 9(2):177–82. doi: [10.1038/nrm2309](https://doi.org/10.1038/nrm2309) PMID: [18059412](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18059412/).
15. Greider CW, Blackburn EH. The telomere terminal transferase of Tetrahymena is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell.* 1987; 51(6):887–98. PMID: [3319189](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3319189/).
16. Wellinger RJ, Zakian VA. Everything you ever wanted to know about *Saccharomyces cerevisiae* telomeres: beginning to end. *Genetics.* 2012; 191(4):1073–105. doi: [10.1534/genetics.111.137851](https://doi.org/10.1534/genetics.111.137851) PMID: [22879408](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22879408/); PubMed Central PMCID: [PMC3415994](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3415994/).
17. Lundblad V, Blackburn EH. An alternative pathway for yeast telomere maintenance rescues est1-senescence. *Cell.* 1993; 73(2):347–60. PMID: [8477448](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8477448/).
18. Singer MS, Gottschling DE. TLC1: template RNA component of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase. *Science.* 1994; 266(5184):404–9. PMID: [7545955](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7545955/)

19. Le S, Moore JK, Haber JE, Greider CW. RAD50 and RAD51 define two pathways that collaborate to maintain telomeres in the absence of telomerase. *Genetics*. 1999; 152(1):143–52. PMID: [10224249](#)
20. Teng SC, Zakian VA. Telomere-telomere recombination is an efficient bypass pathway for telomere maintenance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 1999; 19(12):8083–93. PMID: [10567534](#)
21. Potts PR, Yu H. The SMC5/6 complex maintains telomere length in ALT cancer cells through SUMOylation of telomere-binding proteins. *Nat Struct Mol Biol*. 2007; 14(7):581–90. doi: [10.1038/nsmb1259](#) PMID: [17589526](#)
22. Chavez A, George V, Agrawal V, Johnson FB. Sumoylation and the structural maintenance of chromosomes (Smc) 5/6 complex slow senescence through recombination intermediate resolution. *J Biol Chem*. 2010; 285(16):11922–30. doi: [10.1074/jbc.M109.041277](#) PMID: [20159973](#); PubMed Central PMCID: PMC2852929.
23. Noel JF, Wellinger RJ. Abrupt telomere losses and reduced end-resection can explain accelerated senescence of Smc5/6 mutants lacking telomerase. *DNA Repair (Amst)*. 2011; 10(3):271–82. doi: [10.1016/j.dnarep.2010.11.010](#) PMID: [21190904](#)
24. Wan Y, Zuo X, Zhuo Y, Zhu M, Danziger SA, Zhou Z. The functional role of SUMO E3 ligase Mms21p in the maintenance of subtelomeric silencing in budding yeast. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013; 438(4):746–52. doi: [10.1016/j.bbrc.2013.07.096](#) PMID: [23911609](#)
25. Louis EJ. The chromosome ends of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 1995; 11(16):1553–73. PMID: [8720065](#)
26. Louis EJ, Haber JE. The subtelomeric Y' repeat family in *Saccharomyces cerevisiae*: an experimental system for repeated sequence evolution. *Genetics*. 1990; 124(3):533–45. PMID: [2179052](#); PubMed Central PMCID: PMC1203947.
27. Louis EJ, Haber JE. The structure and evolution of subtelomeric Y' repeats in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 1992; 131(3):559–74. PMID: [1628806](#)
28. Longtine MS, Wilson NM, Petracek ME, Berman J. A yeast telomere binding activity binds to two related telomere sequence motifs and is indistinguishable from RAP1. *Curr Genet*. 1989; 16(4):225–39. PMID: [2697465](#)
29. Wotton D, Shore D. A novel Rap1p-interacting factor, Rif2p, cooperates with Rif1p to regulate telomere length in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev*. 1997; 11(6):748–60. PMID: [9087429](#)
30. Levy DL, Blackburn EH. Counting of Rif1p and Rif2p on *Saccharomyces cerevisiae* telomeres regulates telomere length. *Mol Cell Biol*. 2004; 24(24):10857–67. doi: [10.1128/MCB.24.24.10857-10867.2004](#) PMID: [15572688](#); PubMed Central PMCID: PMC533994.
31. Hardy CF, Sussel L, Shore D. A RAP1-interacting protein involved in transcriptional silencing and telomere length regulation. *Genes Dev*. 1992; 6(5):801–14. PMID: [1577274](#)
32. Teng SC, Chang J, McCowan B, Zakian VA. Telomerase-independent lengthening of yeast telomeres occurs by an abrupt Rad50p-dependent, Rif-inhibited recombinational process. *Mol Cell*. 2000; 6(4):947–52. PMID: [11090632](#)
33. Moretti P, Freeman K, Coodly L, Shore D. Evidence that a complex of SIR proteins interacts with the silencer and telomere-binding protein RAP1. *Genes Dev*. 1994; 8(19):2257–69. PMID: [7958893](#)
34. Buck SW, Shore D. Action of a RAP1 carboxy-terminal silencing domain reveals an underlying competition between HMR and telomeres in yeast. *Genes Dev*. 1995; 9(3):370–84. PMID: [7867933](#)
35. Hecht A, Laroche T, Strahl-Bolsinger S, Gasser SM, Grunstein M. Histone H3 and H4 N-termini interact with SIR3 and SIR4 proteins: a molecular model for the formation of heterochromatin in yeast. *Cell*. 1995; 80(4):583–92. PMID: [7867066](#)
36. Strahl-Bolsinger S, Hecht A, Luo K, Grunstein M. SIR2 and SIR4 interactions differ in core and extended telomeric heterochromatin in yeast. *Genes Dev*. 1997; 11(1):83–93. PMID: [9000052](#)
37. Maillet L, Boscheron C, Gotta M, Marcand S, Gilson E, Gasser SM. Evidence for silencing compartments within the yeast nucleus: a role for telomere proximity and Sir protein concentration in silencer-mediated repression. *Genes Dev*. 1996; 10(14):1796–811. PMID: [8698239](#)
38. Azzalin CM, Reichenbach P, Khoriatuli L, Giulotto E, Lingner J. Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends. *Science*. 2007; 318(5851):798–801. doi: [10.1126/science.1147182](#) PMID: [17916692](#)
39. Luke B, Panza A, Redon S, Iglesias N, Li Z, Lingner J. The Rat1p 5' to 3' exonuclease degrades telomeric repeat-containing RNA and promotes telomere elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell*. 2008; 32(4):465–77. doi: [10.1016/j.molcel.2008.10.019](#) PMID: [19026778](#)
40. Schoeffner S, Blasco MA. Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II. *Nat Cell Biol*. 2008; 10(2):228–36. doi: [10.1038/ncb1685](#) PMID: [18157120](#)

41. Iglesias N, Redon S, Pfeiffer V, Dees M, Lingner J, Luke B. Subtelomeric repetitive elements determine TERRA regulation by Rap1/Rif and Rap1/Sir complexes in yeast. *EMBO Rep.* 2011; 12(6):587–93. doi: [10.1038/embor.2011.73](https://doi.org/10.1038/embor.2011.73) PMID: [21525956](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21525956/); PubMed Central PMCID: PMC3128280.
42. Branzei D, Sollier J, Liberi G, Zhao X, Maeda D, Seki M, et al. Ubc9- and mms21-mediated sumoylation counteracts recombinogenic events at damaged replication forks. *Cell.* 2006; 127(3):509–22. doi: [10.1016/j.cell.2006.08.050](https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.08.050) PMID: [17081974](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17081974/).
43. Ampatzidou E, Irmisch A, O'Connell MJ, Murray JM. Smc5/6 is required for repair at collapsed replication forks. *Mol Cell Biol.* 2006; 26(24):9387–401. doi: [10.1128/MCB.01335-06](https://doi.org/10.1128/MCB.01335-06) PMID: [17030601](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17030601/); PubMed Central PMCID: PMC1698528.
44. Irmisch A, Ampatzidou E, Mizuno K, O'Connell MJ, Murray JM. Smc5/6 maintains stalled replication forks in a recombination-competent conformation. *EMBO J.* 2009; 28(2):144–55. doi: [10.1038/emboj.2008.273](https://doi.org/10.1038/emboj.2008.273) PMID: [19158664](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19158664/); PubMed Central PMCID: PMC2634738.
45. Sollier J, Driscoll R, Castellucci F, Foiani M, Jackson SP, Branzei D. The *Saccharomyces cerevisiae* Esc2 and Smc5-6 proteins promote sister chromatid junction-mediated intra-S repair. *Mol Biol Cell.* 2009; 20(6):1671–82. doi: [10.1091/mbc.E08-08-0875](https://doi.org/10.1091/mbc.E08-08-0875) PMID: [19158389](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19158389/); PubMed Central PMCID: PMC2655255.
46. Choi K, Szakal B, Chen YH, Branzei D, Zhao X. The Smc5/6 complex and Esc2 influence multiple replication-associated recombination processes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell.* 2010; 21(13):2306–14. doi: [10.1091/mbc.E10-01-0050](https://doi.org/10.1091/mbc.E10-01-0050) PMID: [20444977](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20444977/); PubMed Central PMCID: PMC2893993.
47. Bustard DE, Menolfi D, Jeppsson K, Ball LG, Dewey SC, Shirahige K, et al. During replication stress, non-SMC element 5 (NSE5) is required for Smc5/6 protein complex functionality at stalled forks. *J Biol Chem.* 2012; 287(14):11374–83. doi: [10.1074/jbc.M111.336263](https://doi.org/10.1074/jbc.M111.336263) PMID: [22303010](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22303010/); PubMed Central PMCID: PMC3322872.
48. Tittel-Elmer M, Lengronne A, Davidson MB, Bacal J, Francois P, Hohl M, et al. Cohesin association to replication sites depends on rad50 and promotes fork restart. *Mol Cell.* 2012; 48(1):98–108. doi: [10.1016/j.molcel.2012.07.004](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.07.004) PMID: [2285006](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2285006/); PubMed Central PMCID: PMC3904740.
49. Crabbe L, Thomas A, Pantescio V, De Vos J, Pasero P, Lengronne A. Analysis of replication profiles reveals key role of RFC-Ctf18 in yeast replication stress response. *Nat Struct Mol Biol.* 2010; 17(11):1391–7. doi: [10.1038/nsmb.1932](https://doi.org/10.1038/nsmb.1932) PMID: [20972444](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20972444/).
50. Ben-Aroya S, Coombes C, Kwok T, O'Donnell KA, Boeke JD, Hieter P. Toward a comprehensive temperature-sensitive mutant repository of the essential genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell.* 2008; 30(2):248–58. doi: [10.1016/j.molcel.2008.02.021](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.02.021) PMID: [18439903](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18439903/); PubMed Central PMCID: PMC4130347.
51. Shore D. RAP1: a protean regulator in yeast. *Trends Genet.* 1994; 10(11):408–12. PMID: [7809947](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7809947/)
52. Palladino F, Laroche T, Gilson E, Axelrod A, Pillus L, Gasser SM. SIR3 and SIR4 proteins are required for the positioning and integrity of yeast telomeres. *Cell.* 1993; 75(3):543–55. PMID: [8221893](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8221893/)
53. Gotta M, Laroche T, Formenton A, Maillet L, Scherthan H, Gasser SM. The clustering of telomeres and colocalization with Rap1, Sir3, and Sir4 proteins in wild-type *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol.* 1996; 134(6):1349–63. PMID: [8830766](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8830766/)
54. Laroche T, Martin SG, Gotta M, Gorham HC, Pryde FE, Louis EJ, et al. Mutation of yeast Ku genes disrupts the subnuclear organization of telomeres. *Curr Biol.* 1998; 8:653–6. PMID: [9635192](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9635192/)
55. Taddei A, Van Houwe G, Nagai S, Erb I, van Nimwegen E, Gasser SM. The functional importance of telomere clustering: global changes in gene expression result from SIR factor dispersion. *Genome research.* 2009; 19(4):611–25. doi: [10.1101/gr.083881.108](https://doi.org/10.1101/gr.083881.108) PMID: [19179643](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19179643/); PubMed Central PMCID: PMC2665780.
56. Ferreira HC, Luke B, Schober H, Kalck V, Lingner J, Gasser SM. The PIAS homologue Siz2 regulates perinuclear telomere position and telomerase activity in budding yeast. *Nat Cell Biol.* 2011; 13(7):867–74. doi: [10.1038/ncb2263](https://doi.org/10.1038/ncb2263) PMID: [21666682](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21666682/).
57. Pasupala N, Easwaran S, Hannan A, Shore D, Mishra K. The SUMO E3 ligase Siz2 exerts a locus-dependent effect on gene silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell.* 2012; 11(4):452–62. doi: [10.1128/EC.05243-11](https://doi.org/10.1128/EC.05243-11) PMID: [22345352](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22345352/); PubMed Central PMCID: PMC3318298.
58. Duan X, Yang Y, Chen YH, Arenz J, Rangl GK, Zhao X, et al. Architecture of the Smc5/6 Complex of *Saccharomyces cerevisiae* Reveals a Unique Interaction between the Nse5-6 Subcomplex and the Hinge Regions of Smc5 and Smc6. *J Biol Chem.* 2009; 284(13):8507–15. doi: [10.1074/jbc.M809139200](https://doi.org/10.1074/jbc.M809139200) PMID: [19141609](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19141609/); PubMed Central PMCID: PMC2659209.
59. Aparicio OM, Billington BL, Gottschling DE. Modifiers of position effect are shared between telomeric and silent mating-type loci in *S. cerevisiae*. *Cell.* 1991; 66(6):1279–87. PMID: [1913809](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1913809/)

60. Gottschling DE, Aparicio OM, Billington BL, Zakian VA. Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: reversible repression of Pol II transcription. *Cell*. 1990; 63(4):751–62. PMID: [2225075](#)
61. Kueng S, Tsai-Pflugfelder M, Oppikofer M, Ferreira HC, Roberts E, Tsai C, et al. Regulating repression: roles for the sir4 N-terminus in linker DNA protection and stabilization of epigenetic states. *PLoS genetics*. 2012; 8(5):e1002727. doi: [10.1371/journal.pgen.1002727](#) PMID: [22654676](#); PubMed Central PMCID: PMC3359979.
62. Ellahi A, Thurtle DM, Rine J. The Chromatin and Transcriptional Landscape of Native *Saccharomyces cerevisiae* Telomeres and Subtelomeric Domains. *Genetics*. 2015; 200(2):505–21. doi: [10.1534/genetics.115.175711](#) PMID: [25823445](#); PubMed Central PMCID: PMC4492376.
63. Shi T, Bunker RD, Mattarocci S, Ribeyre C, Faty M, Gut H, et al. Rif1 and Rif2 shape telomere function and architecture through multivalent Rap1 interactions. *Cell*. 2013; 153(6):1340–53. doi: [10.1016/j.cell.2013.05.007](#) PMID: [23746845](#).
64. Cockell M, Palladino F, Laroche T, Kyron G, Liu C, Lustig AJ, et al. The carboxy termini of Sir4 and Rap1 affect Sir3 localization: evidence for a multicomponent complex required for yeast telomeric silencing. *J Cell Biol*. 1995; 129(4):909–24. PMID: [7744964](#)
65. Hazbun TR, Malmstrom L, Anderson S, Graczyk BJ, Fox B, Riffle M, et al. Assigning function to yeast proteins by integration of technologies. *Mol Cell*. 2003; 12(6):1353–65. PMID: [14690591](#).
66. Craven RJ, Petes TD. Dependence of the regulation of telomere length on the type of subtelomeric repeat in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 1999; 152(4):1531–41. PMID: [10430581](#)
67. Bonetti D, Clerici M, Anbalagan S, Martina M, Lucchini G, Longhese MP. Shelterin-like proteins and Yku inhibit nucleolytic processing of *Saccharomyces cerevisiae* telomeres. *PLoS genetics*. 2010; 6(5):e1000966. doi: [10.1371/journal.pgen.1000966](#) PMID: [20523746](#); PubMed Central PMCID: PMC2877729.
68. Marcand S, Pardo B, Gratias A, Cahun S, Callebaut I. Multiple pathways inhibit NHEJ at telomeres. *Genes Dev*. 2008; 22(9):1153–8. doi: [10.1101/gad.455108](#) PMID: [18451106](#); PubMed Central PMCID: PMC2335312.
69. Anbalagan S, Bonetti D, Lucchini G, Longhese MP. Rif1 supports the function of the CST complex in yeast telomere capping. *PLoS genetics*. 2011; 7(3):e1002024. doi: [10.1371/journal.pgen.1002024](#) PMID: [21437267](#); PubMed Central PMCID: PMC3060071.
70. Deng Z, Norseen J, Wiedmer A, Riethman H, Lieberman PM. TERRA RNA binding to TRF2 facilitates heterochromatin formation and ORC recruitment at telomeres. *Mol Cell*. 2009; 35(4):403–13. doi: [10.1016/j.molcel.2009.06.025](#) PMID: [19716786](#); PubMed Central PMCID: PMC2749977.
71. Sandell LL, Gottschling DE, Zakian VA. Transcription of a yeast telomere alleviates telomere position effect without affecting chromosome stability. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91(25):12061–5. PMID: [7991584](#)
72. Cusanelli E, Romero CA, Chartrand P. Telomeric noncoding RNA TERRA is induced by telomere shortening to nucleate telomerase molecules at short telomeres. *Mol Cell*. 2013; 51(6):780–91. doi: [10.1016/j.molcel.2013.08.029](#) PMID: [24074956](#).
73. Maicher A, Kastner L, Dees M, Luke B. Deregulated telomere transcription causes replication-dependent telomere shortening and promotes cellular senescence. *Nucleic Acids Res*. 2012; 40(14):6649–59. doi: [10.1093/nar/gks358](#) PMID: [22553368](#); PubMed Central PMCID: PMC3413150.
74. Pfeiffer V, Lingner J. TERRA promotes telomere shortening through exonuclease 1-mediated resection of chromosome ends. *PLoS genetics*. 2012; 8(6):e1002747. doi: [10.1371/journal.pgen.1002747](#) PMID: [22719262](#); PubMed Central PMCID: PMC3375253.
75. Taddei A, Hediger F, Neumann FR, Bauer C, Gasser SM. Separation of silencing from perinuclear anchoring functions in yeast Ku80 Sir4 and Esc1 proteins. *EMBO J*. 2004; 25:in press.
76. Mondoux MA, Scaife JG, Zakian VA. Differential nuclear localization does not determine the silencing status of *Saccharomyces cerevisiae* telomeres. *Genetics*. 2007; 177(4):2019–29. doi: [10.1534/genetics.107.079848](#) PMID: [18073421](#); PubMed Central PMCID: PMC2219492.
77. Hediger F, Neumann FR, Van Houwe G, Dubrana K, Gasser SM. Live Imaging of Telomeres. yKu and Sir Proteins Define Redundant Telomere-Anchoring Pathways in Yeast. *Curr Biol*. 2002; 12(24):2076–89. PMID: [12498682](#).
78. Hannich JT, Lewis A, Kroetz MB, Li SJ, Heide H, Emili A, et al. Defining the SUMO-modified proteome by multiple approaches in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 2005; 280(6):4102–10. doi: [10.1074/jbc.M413209200](#) PMID: [15590687](#).
79. Wohlschlegel JA, Johnson ES, Reed SI, Yates JR 3rd. Global analysis of protein sumoylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 2004; 279(44):45662–8. doi: [10.1074/jbc.M409203200](#) PMID: [15326169](#).

80. Kirkland JG, Peterson MR, Still CD 2nd, Brueggeman L, Dhillon N, Kamakaka RT. Heterochromatin formation via recruitment of DNA repair proteins. *Mol Biol Cell*. 2015; 26(7):1395–410. doi: [10.1091/mbc.E14-09-1413](https://doi.org/10.1091/mbc.E14-09-1413) PMID: [25631822](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25631822/); PubMed Central PMCID: PMC4454184.
81. Gotta M, Palladino F, Gasser SM. Functional characterization of the N terminus of Sir3p. *Mol Cell Biol*. 1998; 18(10):6110–20. PMID: [9742128](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9742128/)
82. Tittel-Elmer M, Alabert C, Pasero P, Cobb JA. The MRX complex stabilizes the replisome independently of the S phase checkpoint during replication stress. *EMBO J*. 2009; 28(8):1142–56. doi: [10.1038/emboj.2009.60](https://doi.org/10.1038/emboj.2009.60) PMID: [19279665](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19279665/); PubMed Central PMCID: PMC2683708.
83. Gotta M, Laroche T, Gasser SM. Analysis of nuclear organization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol*. 1999; 304:663–72. PMID: [10372389](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10372389/)
84. Puglisi A, Bianchi A, Lemmens L, Damay P, Shore D. Distinct roles for yeast Stn1 in telomere capping and telomerase inhibition. *EMBO J*. 2008; 27(17):2328–39. doi: [10.1038/emboj.2008.158](https://doi.org/10.1038/emboj.2008.158) PMID: [19172739](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19172739/); PubMed Central PMCID: PMC2529371.
85. Psakhye I, Jentsch S. Protein group modification and synergy in the SUMO pathway as exemplified in DNA repair. *Cell*. 2012; 151(4):807–20. doi: [10.1016/j.cell.2012.10.021](https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.10.021) PMID: [23122649](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23122649/).
86. Aushubel FM, Brent R, Kinston R, Moore D, Seidman JJ, Smith J, et al. *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley and Sons; 1994.
87. Adams A, Gottschling DE, Kaiser CA, Stearns T. *Methods in Yeast Genetics*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997.

**Annexe 2 – Imagerie de l'ARN de la télomérase chez la
levure *Saccharomyces cerevisiae* et en cellules humaines par
hybridation fluorescente *in situ*.**

**Telomerase RNA Imaging in Budding Yeast and Human Cells by Fluorescent In
Situ Hybridization**

Auteurs: David Guérit, Maxime Lalonde, Pascal Chartrand

Publié dans : Methods in Molecular Biology **en** 2018

Chapter 27

Telomerase RNA Imaging in Budding Yeast and Human Cells by Fluorescent In Situ Hybridization

David Guérit, Maxime Lalonde, and Pascal Chartrand

Abstract

Telomerase, the enzyme that elongates telomeres in most eukaryotes, is a ribonucleoprotein complex composed of a reverse transcriptase catalytic subunit (TERT in human, Est2 in the budding yeast *S. cerevisiae*), regulatory factors and a noncoding RNA called hTERC (in human) or *TLC1* (in budding yeast). Telomerase trafficking is a major process in the biogenesis and regulation of telomerase action at telomeres. Due to its higher signal-to-noise ratio, imaging of the telomerase RNA moiety is frequently used to determine telomerase intracellular localization. Here we describe how to image telomerase RNA in human and yeast cells using fluorescence in situ hybridization.

Key words Telomerase, Fluorescent in situ hybridization, RNA localization, *TLC1* RNA, hTERC

1 Introduction

Telomerase biogenesis and action at telomeres is linked to its cellular trafficking and localization [1]. The link between telomerase RNA maturation and trafficking has been well studied in the budding yeast *S. cerevisiae*. The budding yeast telomerase RNA (*TLC1*) life cycle includes many events that occur at various subcellular localizations. As part of its biogenesis, this RNA goes to the nucleolus for its 5' end maturation, and is exported to the cytoplasm for assembly of the holoenzyme [2–4]. Telomerase is then reimported in the nucleus, and its nuclear accumulation depends on the yKu complex, which interacts with the *TLC1* RNA [2, 5, 6].

In human cells, telomerase RNA (hTERC or hTR) localization depends on its maturation status. After transcription, hTERC 3' end processing possibly occurs in the nucleolus, since 3' end extended hTERC precursors can be detected in this subnuclear compartment [7]. hTERC is a small Cajal body RNA (scaRNA) which accumulates in Cajal bodies in human cancer cells [8, 9]. This localization depends on the interaction between a CAB box element in hTERC with the Cajal body protein TCAB1 [8, 10].

Despite the fact that other techniques exist, such as live cell imaging [11], RNA fluorescence in situ hybridization (RNA-FISH) remains the technique of reference to study telomerase RNA localization. As a ribonucleoprotein complex, telomerase localization can be studied using RNA-FISH by imaging its RNA component. Properly designed FISH probes can push the sensitivity to image single telomerase RNA molecules, which is not always possible by immunofluorescence on proteins [12]. It is also important to note that RNA-FISH is noninvasive and does not require genetic modification of its target, which allows the study of endogenous telomerase RNA. In budding yeast, a mix of oligonucleotide probes labeled with an organic dye can be used to detect the endogenous *TLC1* RNA [2]. A standard inverted epifluorescence microscope equipped with a CCD camera is enough to detect single molecules of *TLC1* RNA. Regarding human cells, the small size of hTERC RNA (450 nt) and its high GC content, limit the number of probes that can be designed to detect this RNA, which results in low signal-to-noise ratio and therefore prevents the detection of single molecules. Therefore, only the accumulation of hTERC RNA in large foci or in Cajal bodies can be detected [8, 9].

RNA-FISH on telomerase RNA can easily be combined with immunofluorescence (IF) to investigate its colocalization with different proteins or telomeres. Indeed, several studies successfully described the colocalization between telomerase RNA and Cajal bodies in human cancer cells, or between telomerase RNA and telomeres in both yeast and human cells using simultaneous RNA-FISH and immunofluorescence [2, 10, 13–16].

2 Materials

2.1 Preparation of Poly-L-Lysine-Coated Coverslips

1. Glass coverslips (22 × 22 mm #1.5).
2. Six 35 mm well plastic plates.
3. Poly-L-lysine, diluted to 0.01% in DEPC water.

2.2 Probe Design and Preparation

The probes contain amino-allyl deoxythymidine (N-allyl-dT) modified nucleotides, allowing covalent dye coupling to the probe. Oligonucleotides may vary in length and N-allyl-dT modification is incorporated every ten base pair for >20 bases oligonucleotide, and only at the 5' or 3' end for oligonucleotide of about 20 bases. Tables 1 and 2 include the sequences of the probes used for *TLC1* and hTERC FISH in yeast and human cells, respectively.

1. G25 Mini quick spin columns (Roche Life Science).
2. Cy3 or Cy5 monoreactive dye pack (GE Healthcare).
3. Sodium bicarbonate buffer 0.1 M pH 8.8: prepare 0.1 M of sodium carbonate (Na_2CO_3) and sodium bicarbonate

Table 1
Sequences of the modified oligonucleotides for *TLC1* FISH

TLC1-1	t*gcgcacacacaagcat*ctacactgacaccagcat*actcgaaattctt*tg
TLC1-2	ct*aataacaatt*agctgtacatt*tgtgtgtgggt*gtggtgatgg*aggc
TLC1-3	*ccagagttaacgat*aagatagacat*aaagtgacagcgt*tagcacct*
TLC1-4	ttacgt*tcttgatctt*gtgtcattgtt*cagttactgat*cgccgcaaact*
TLC1-5	tgcat*cgaaggcat>taggagaagt*agctgtgaat*acaaccaaat*tca

*Amino allyl modified-T

Table 2
Sequences of the modified oligonucleotides for hTERC FISH

hTERC-1	t*gcgcgcggggagcaaaagcacggcgct*acgcccttctcagtt*agggttagaca
hTERC-2	gct*gacattttt*tgtttgctct*agaatgaacgt*ggaaggcggcaggccgaggct*t

*Amino allyl modified-T

(NaHCO₃) solutions (106 mg Na₂CO₃ and 84 mg NaHCO₃ in 10 mL of DEPC treated water). Add Na₂CO₃ to NaHCO₃ until a pH of 8.8 is reached.

2.3 Preparation of Mounting Media

1. 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI).
2. p-phenylenediamine.
3. Glycerol.

2.4 Fluorescent In Situ Hybridization on Yeast Cells

1. 32% paraformaldehyde, electronic microscopy grade, single-use sealed ampules (Electron Microscope Sciences) (*see Note 1*).
2. Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF). Prepare a 17.5 mg/mL stock solution in ethanol, keep at −20 °C.
3. Vanadyl Ribonucleoside Complex (VRC) 200 mM (New England Biolabs #S1402S).
4. β-mercaptoethanol.
5. 70% ethanol solution prepared with DEPC water.
6. Lyticase from *Arthrobacter luteus* (Sigma-Aldrich #L2524). Reconstituted in 1× PBS at 25 U/μL. Store 30 μL (600 U) aliquot at −20 °C.
7. Protease inhibitor cocktail tablets (Roche #04 693 132 001). Dissolve 1 tablet in 1 mL DEPC water for a 50× concentrated solution.
8. 1× Buffer B: 1.2 M Sorbitol, 0.1 M potassium phosphate pH 7.5 (200 mL needed per sample, can be kept for a few month at 4 °C).

9. 28 mM β -mercaptoethanol, 0.06 mg/mL PMSF, protease inhibitor cocktail 1 \times . Prepare fresh.
10. Formamide.
11. *Escherichia coli* tRNA (e.g., Roche #10 109 541 001).
12. Single-stranded DNA from salmon testes (ssDNA) 10 mg/mL (e.g., Sigma #D9156).
13. Solution of *E. coli* tRNA and salmon sperm single-stranded DNA in a 1:1 ratio (5 mg/mL each).
14. Sodium phosphate buffer 1 M, pH 7. Dissolve 11.9 g of sodium phosphate in 50 mL of DEPC water, adjust pH to 7 and make up to 100 mL with DEPC water, can be kept at room temperature.
15. Buffer F: 80% formamide, 10 mM sodium phosphate pH 7, freshly made, 15 μ L per sample.
16. Labeled probes, *see* Subheading 3.2.
17. Parafilm.
18. RNase free BSA 20 mg/mL.
19. Coplin Jars for 22 \times 22 mm coverslips.
20. Glass plate (16 \times 20 cm).
21. Forceps.
22. 20 \times SSC. Dissolve 175.3 g NaCl and 88.2 g of sodium citrate in 1 L of water. Adjust pH to 7 with HCl. Treat with 0.1% DEPC overnight and autoclave. Keep at room temperature.
23. 2 \times SSC, 40% formamide in DEPC water, freshly made. Can be stored at 4 $^{\circ}$ C for 2 days.
24. Buffer H: 4 \times SSC, 20 mM VRC, 4 μ g/ μ L BSA, 20 U RNase OUT, freshly made.
25. 2 \times SSC, from 20 \times SSC diluted in DEPC water.
26. 1 \times SSC, from 20 \times SSC diluted in DEPC water.
27. Triton X-100 (Sigma-Aldrich).
28. Frosted microscope slides (76 \times 26 \times 1 mm).
29. Transparent nail polish.
30. 20 \times PBS. Dissolve in 1 L water 2.88 g of sodium phosphate dibasic (Na₂HPO₄), 160 g sodium chloride (NaCl), 4 g potassium phosphate dibasic (KH₂PO₄) and 4 g potassium chloride (KCl), adjust pH to 7.2 with sodium hydroxide (NaOH). Treat with 0.1% DEPC overnight and autoclave. Store at room temperature.
31. 2 \times SSC, 0.1% Triton X-100, freshly made. Can be stored at 4 $^{\circ}$ C for 2 days.

2.5 Fluorescence In Situ Hybridization on Human Cells

1. Coplin jars.
2. 32% Paraformaldehyde, electronic microscopy grade, single-use sealed ampules (Electron Microscope Sciences) (*see Note 1*).
3. 1× phosphate buffered saline (PBS), diluted from 20× PBS in DEPC water, *see* Subheading 2.4, item 4.
4. Triton X-100 (Sigma-Aldrich).
5. Fixative solution: 3.2% paraformaldehyde in 1× PBS.
6. Permeabilization solution: 0.5% Triton X-100 in 1× PBS.
7. Formamide.
8. Dextran sulfate, make a 50% W/V solution in DEPC water.
9. *Escherichia coli* tRNA (Roche #10109541001). Dissolved at 10 mg/mL in DEPC water, store at −20 °C.
10. Single-stranded DNA from salmon testes (ssDNA) 10 mg/mL (e.g., Sigma-Aldrich #D9156).
11. Bovine serum albumin RNase free (e.g., Roche #10711454001).
12. Vanadyl Ribonucleoside Complex (VRC) 200 mM (New England Biolabs #S1402S).
13. 20× SSC, *see* Subheading 2.4, item 3.
14. 2× SSC in 40% formamide, store at 4 °C for maximum 2 days.
15. Solution A, for ten coverslips: mix 80 µL of formamide with 20 µL of 20× SSC.
16. Solution B, for 10 coverslips: mix 20 µL of BSA with 40 µL of 50% dextran sulfate and 2 µL 200 mM of VRC, complete with 38 µL of DEPC water.
17. Large glass plate (16 × 20 cm).
18. Parafilm.
19. Formamide.
20. Probes as described Subheading 3.2.
21. 20× SSC, *see* Subheading 2.4, item 3.
22. Frosted microscope slides.
23. Mounting media, *see* Subheading 3.4.
24. Transparent nail polish.
25. Formamide.
26. 1× PBS, diluted from 20× PBS, *see* Subheading 2.4, item 4.
27. Tween 20.
28. 20× SSC, *see* Subheading 2.4, item 3.
29. Wash solution 1: 2× SSC, 40% formamide in DEPC water.
30. 1× PBS, 0.1% Tween 20.

3 Methods

3.1 Preparation of Poly-L-Lysine-Coated Coverslips

Yeast cells do not adhere stably on glass or plastic. Coverslips must be pretreated with a coating agent to assure that cells will stay on the coverslips during the hybridization and washing steps. We use poly-L-lysine, but alternatively concanavalin A can be used.

At the opposite, human cells adhere easily to glass but repeated washes during the process have the tendency to remove cells from coverslips and to alter normal cell shape. This can be prevented by using, as for yeast, poly-L-lysine-coated coverslips.

1. Coverslips are stripped using hydrochloric acid as follow: in a 1 L glass beaker, immerge a large number of coverslips with about 250 mL of HCl 0.1 N and cover it with aluminum foil.
2. Boil 30 min in a fume hood.
3. Let the beaker cool down and discard the HCl.
4. Wash the coverslips ten times with DEPC water. Leave at least 100 mL of water in the beaker after the last wash.
5. Cover the beaker filled with the coverslips with aluminum foil and autoclave it. Once autoclaved, the coverslips can be stored at 4 °C for several months. Alternatively, coverslips can be stored in 50 mL tubes filled with 75% ethanol, this has the advantage of a faster drying.
6. Place one coverslip in each well of a six-well plastic plate and let them dry.
7. Dilute poly-L-lysine at 0.01% in water, filtrate through 0.22 µm filter and apply 200–500 µL of diluted poly-L-lysine on each coverslip. The solution should cover at least 75% of the coverslip surface.
8. Incubate at room temperature for 5 min to let the poly-L-lysine adhere.
9. Aspirate the excess of poly-L-lysine and let dry completely. This will take around 3–4 h. Coverslips may stick to the bottom of the wells. During the washes, they will eventually get free.
10. Once dried, wash each coverslips with 3 mL sterile water three times. These washes are important to avoid excess adherence of yeast cells on the coverslips that will lead to aggregates formation instead of a single layer of individual cells.
11. After the last wash, rest each coverslip on the wall of the well to be sure they do not get stuck at the bottom while drying. Aspirate the excess and let dry completely.
12. The coverslips can be kept at room temperature for several months inside the six well plates.

3.2 Probe Design and Preparation

1. Using a Speed Vac, lyophilize 10 µg of each probe in RNase-free Eppendorf tubes (do not heat).
2. Resuspend the probes in 35 µL of sodium carbonate buffer.
3. Prepare the cyanine dye: dissolve the content of one vial in 30 µL DEPC water. One vial can be used to label 2 probes. See manufacturer instruction/ protocol for more details.
4. Add 15 µL of the reconstituted cyanine dye to each probe.
5. Incubate at room temperature for 16–24 h in the dark with occasional vortexing.
6. Purify the probe using a G25 oligo column.
 - (a) Prepare the column: open the top of the column and break the bottom seal. Remove the buffer by spinning the column in a 2 mL tube at $2500 \times g$ for 1 min, discard the flow through.
 - (b) Place the column in a new 1.5 mL RNase free Eppendorf. Apply the 50 µL labeled probe in the center of the column and centrifuge at $2500 \times g$ for 4 min. Discard the column and determine the labeling efficiency of the probes (*see Note 2*).
7. Keep labeled probes at -80°C in opaque RNase-free tubes.

3.3 Calculation of Fluorophore Incorporation

1. Measure the optical density at 260 nm to determine DNA concentration and at 552 nm (Cy3) or 650 nm (Cy5) for cyanine concentration. Usually a 1/50 dilution is needed and sufficient to avoid signal saturation.
2. Calculate the incorporation efficiency using the molecular extinction coefficient (MEC) of the oligonucleotide and cyanine dye. Given below is the calculation for Cy3 dye.
3. Cy3 labeling of probes by this method gives usually 70–90% incorporation efficiency, meaning that at least 3 modified nucleotides out of 5 have been labeled with Cy3. A reaction having a labeling efficiency below 60% is insufficient and must be redone.

$$[\text{Cy3}] = \frac{A_{552\text{nm}}}{\text{Cy3 MEC}}$$

$$[\text{Oligo}] = \frac{(A_{260\text{nm}} - 0.08(A_{552\text{nm}}))}{\text{Oligo MEC}}$$

$$\text{Incorporation efficiency} = \frac{[\text{Cy3}]}{[\text{Oligo}]}$$

*The MEC of oligonucleotides is the sum of the MEC of each nucleotide.

	MEC ($M^{-1}.cm^{-1}$)
Cy3	150,000 (552 nm)
Cy5	250,000 (650 nm)
Adenosine	15,200 (260 nm)
Cytidine	7050 (260 nm)
Guanine	12,010 (260 nm)
Thymidine	8400 (260 nm)

3.4 Mounting Media Preparation

Mounting media can be easily made; it contains p-phenylenediamine as antifading agent. It is also convenient to add a DNA staining dye such as DAPI or Hoechst.

1. Dissolve 10 mg of p-phenylenediamine in 1 mL of 10× SSC.
2. Add DAPI at the final concentration of 1 μ g/mL.
3. Once completely dissolved, add 9 mL of glycerol, store at 20 °C in opaque tubes. Discard when it becomes dark brown.

3.5 Fluorescent In Situ Hybridization on Yeast Cells

3.5.1 Fixation and Spheroplasting of Yeast Cells

Fixation of the cells is performed by cross-linking with paraformaldehyde (PFA). PFA is a small chemical compound that diffuses easily and rapidly inside the cells, and which cross-links protein–protein, protein–nucleic acid, and nucleic acid–nucleic acid interactions. Once the cells are fixed, keep them on ice to avoid proteolytic and RNase activities. Yeast cells have a cell wall outside their cell membrane that needs to be degraded to allow the probes to diffuse inside the cell. Several enzymes can be used to degrade this cell wall, such as lyticase, chitinase, zymolase, and gluculase. We typically use the lyticase from *Arthrobacter luteus* that hydrolyzes poly- β -(1 \rightarrow 3)-glucose in the cell wall glucan.

1. Grow yeasts in 50 mL of media until mid-log phase growth is reached (OD_{600} between 0.2 and 0.4, starting from 0.05 to 0.1) (*see Note 3*).
2. Add 6.25 mL of 32% paraformaldehyde directly in the culture flask. Incubate at room temperature for 45 min with gentle shaking (*see Note 4*).
3. Transfer the fixed cells in a 50 mL tube and centrifuge at 4 °C at $2500 \times g$ for 4 min.
4. Wash cell pellet three times with ice-cold buffer B to remove the culture media and the PFA. Do not resuspend the cell pellet when washing.
5. Resuspend gently the cell pellet in 1 mL of spheroplasting buffer by pipetting (no vortex).
6. Add 600 U of lyticase and mix by pipetting.

7. Incubate for 8 min in a 30 °C water bath. Invert the tube each minute to avoid sedimentation of the cells (*see Note 5*).
8. Pellet the cells at 4 °C at $2500 \times g$ for 4 min.
9. Wash the cell pellet with 1 mL of ice-cold buffer B.
10. Resuspend gently the cell pellet in 750 μ L of ice-cold buffer B.
11. Gently pipet 100 μ L of the spheroplasting reaction on each prepared coverslips in a six well plate.
12. Let cells adhere for 30 min at 4 °C.
13. Very gently, wash the coverslips with 3 mL of ice-cold buffer B (*see Note 6*).
14. Dehydrate the spheroplasts by adding 5 mL of ice-cold 70% ethanol prepared with DEPC water. Incubate for at least 30 min at -20 °C before performing the hybridization. Spheroplasts can be kept at -20 °C for a maximum of 2 months (*see Note 6*).

3.5.2 Probe Preparation

1. Prepare two coverslips per experiment in case one of the two breaks during handling. The following protocol stands for one coverslip and can be scaled up.
2. In a 1.5 mL tube, add 1 ng of each labeled probe and complete up to 10 μ L with DEPC water.
3. Add 4 μ L of a 5 mg/mL of a solution 1:1 of *E. coli* tRNA and salmon sperm single-stranded DNA.
4. Lyophilize in a speed vac.
5. Resuspend the lyophilized probes in 12 μ L of buffer F.
6. Keep at room temperature in the dark.

3.5.3 Hybridization

1. Cover a glass plate with a layer of Parafilm. Use the back part of a forceps to make the Parafilm adhere to the glass. At this point, all manipulation should be done in dim light.
2. Place the coverslips in a Coplin jar. Make sure the yeast-coated face of each coverslips face the same side (*see Note 7*).
3. Wash two times with 8 mL of $2\times$ SSC for 5 min at room temperature with gentle shaking to rehydrate the cells.
4. Incubate in $2\times$ SSC, 40% formamide for 5 min at room temperature (*see Note 8*).
5. Heat the probes at 95 °C for 3 min.
6. Dilute the probes with 12 μ L of buffer H.
7. Drop the probes (24 μ L) on the layer of Parafilm on the glass plate.
8. Lay the coverslip on the probes, with the spheroplasts side facing the probes (*see Note 9*).

9. Cover the coverslips with another layer of Parafilm. Use the back of the forceps to seal the two layer of Parafilm together, making a humidified hybridization chamber. Wrap the glass plate with aluminum foil and incubate overnight at 37 °C.

3.5.4 Washes and Coverslips Mounting

1. All manipulation should be done in dim light. Cover the Coplin jar in aluminum foil during incubations.
2. Gently put back the coverslips from the glass plate in a Coplin jar with the spheroplasts side facing the same direction.
3. Wash two times with 8 mL of preheated 2× SSC, 40% formamide at 37 °C for 15 min.
4. Wash with 2× SSC, 0.1% Triton X-100 for 15 min at room temperature with gentle shaking.
5. Wash two times with 1× SSC 15 min at room temperature with gentle shaking (*see Note 10*).
6. Incubate in 8 mL of 1× PBS, 1 ng/mL DAPI at room temperature for 2 min.
7. Drop 7 µL of mounting media on a microscope slide.
8. Gently take the coverslip and remove the excess of liquid at the bottom of the coverslip with an absorbent tissue.
9. Lay the coverslip on the mounting media, with the spheroplast side facing the mounting media.
10. Let stand for 2–3 min and then seal the coverslip by applying nail polish on the sides. Let dry. Microscope slides can be stored in the dark at –20 °C for up to 3 months, but image acquisition should be performed as soon as possible to assure good image quality (Fig. 1).

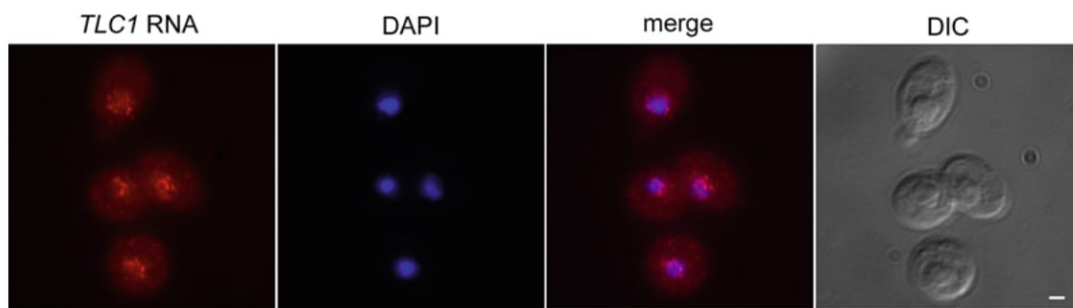


Fig. 1 FISH on budding yeast *TLC1* RNA. Fluorescent in situ hybridization on budding yeast cells with *TLC1* specific probes. Endogenous *TLC1* RNA foci are visible in the nucleus of yeast cells. Acquisition was performed with a Nikon upright epifluorescence microscope and a CoolSnap Photometrics CCD camera. DAPI: nuclear staining, DIC: differential interference contrast. Scale bar = 1 µm

3.6 Fluorescent In Situ Hybridization on Human Cells

To ensure a good cell adherence and a normal shape, cell plating should be made the day before the FISH. Also it is important to reach around 70–80% of cell confluency the day of the fixation, thus the number of cells to plate must be determined empirically for each cell type by plating several cell densities.

3.6.1 Cell Fixation/Permeabilization

All manipulations are done at room temperature and under a fume hood since paraformaldehyde is a toxic chemical.

1. Remove coverslips from the 6 well tissue culture plates containing the cells and place them in a Coplin jar (*see Note 11*).
2. Fill the Coplin jar with 1 × PBS for 5 min, gently rock in your hands few seconds to remove any trace of serum.
3. Remove the PBS and place 7–8 mL of fixative solution, let stand for 15 min.
4. Pour off the fixative solution and wash two times with 7–8 mL of 1 × PBS to ensure a complete removal of paraformaldehyde.
5. Remove the last wash solution, then permeabilize the cells with 7–8 mL of permeabilization solution for 5 min.
6. Wash one time with 1 × PBS.
7. At this point, the cells can be stored in 1 × PBS at 4 °C for a few days. For long-term storage, remove the PBS and add 2 mL of 70% ethanol. Keep at 4 °C, which allows the cells to remain usable for a few weeks.

3.6.2 Probe Preparation

1. All the following steps should be performed in dim light in order to prevent dye photobleaching and thus a loss of signal.
2. For ten coverslips, mix 10 µL of 10 mg/mL ssDNA and 10 µL of 10 mg/mL *E. coli* tRNA in a 1.5 mL Eppendorf tube. Add 200 ng of probe per target RNA. If several probes are used, a total of 200 ng of the pool of probes should be used.
3. Lyophilize the probes using a speed vac. It should take around 20 min.
4. Add 100 µL of solution A, ensure a proper solubilization by vortexing the solution, then place the tube in a heater block at 95 °C for 3 min.
5. Chill the tube on ice for about 5 min.
6. Add 100 µL of solution B, mix well by vortexing.
7. Probes can be stored on ice for few hours.

3.6.3 Hybridization

Hybridization is performed in a buffer containing formamide, in a moist chamber made of Parafilm. If detection of endogenous hTERC is required, hybridization should be performed overnight. If hTERC is overexpressed in the cells, incubation time can be reduced to 2 h.

1. Take coverslips prepared Subheading 3.6.1, they are already in a Coplin jar.
2. Remove the 1× PBS or the 70% ethanol and fill the Coplin jar with 7–8 mL of wash solution, incubate at room temperature for 5 min.
3. Meanwhile clean the glass plate and lay on a piece of Parafilm. Make the Parafilm adhere to the glass plate by scrubbing it with a forceps or a pencil.
4. Using a marker, criss-cross the Parafilm to define zones for coverslips and note the conditions.
5. Drop 20 µL of each probe onto the Parafilm
6. One by one, remove coverslips from the Coplin jar, drain excess of buffer on a paper and carefully deposit on the Parafilm, cells facing the Parafilm. Avoid contact between the coverslips (*see Note 12*).
7. Lay down a new piece of Parafilm onto the first one, seal using forceps or pencil to form a perfect moist chamber.
8. Wrap the glass plate in aluminum foil to protect from light and place at 37 °C overnight.

3.6.4 Washes and Coverslip Mounting

1. Prewarm Coplin jars and 50 mL of wash solution at 37 °C for at least 30 min.
2. Take the glass plate containing coverslips out of the incubator and move one by one the coverslips into the prewarmed Coplin jars. Incubate for 30 min at 37 °C.
3. Remove wash solution and add a new volume of prewarmed wash solution, incubate at 37 °C for another 30 min.
4. Remove wash solution and fill the Coplin jar with 1× PBS, 0.1% Tween 20 containing 1 µg/mL of DAPI. Incubate at room temperature for 5 min.
5. Remove wash solution and fill the Coplin jar with 1× PBS, 0.1% Tween 20. Incubate at room temperature for 5 min.
6. Remove wash solution and fill the Coplin jar with 1× PBS. Incubate at room temperature for 5 min (*see Note 10*).
7. Annotate microscope slides and drop 20 µL of mounting media for each coverslip.
8. Remove coverslips from the Coplin jar, rapidly drain the PBS on a paper towel and apply onto the microscope slide, cell facing the mounting media.
9. Seal coverslips with few drops of nail polish, let dry in the dark.
10. To remove any traces of salt, coverslips can be whipped with a microfiber paper soaked with a drop of lens cleaning solution.
11. Slides are now ready to image. They can be kept up to a week in the dark at 4 °C or a few month at –20 °C. Human TERC foci

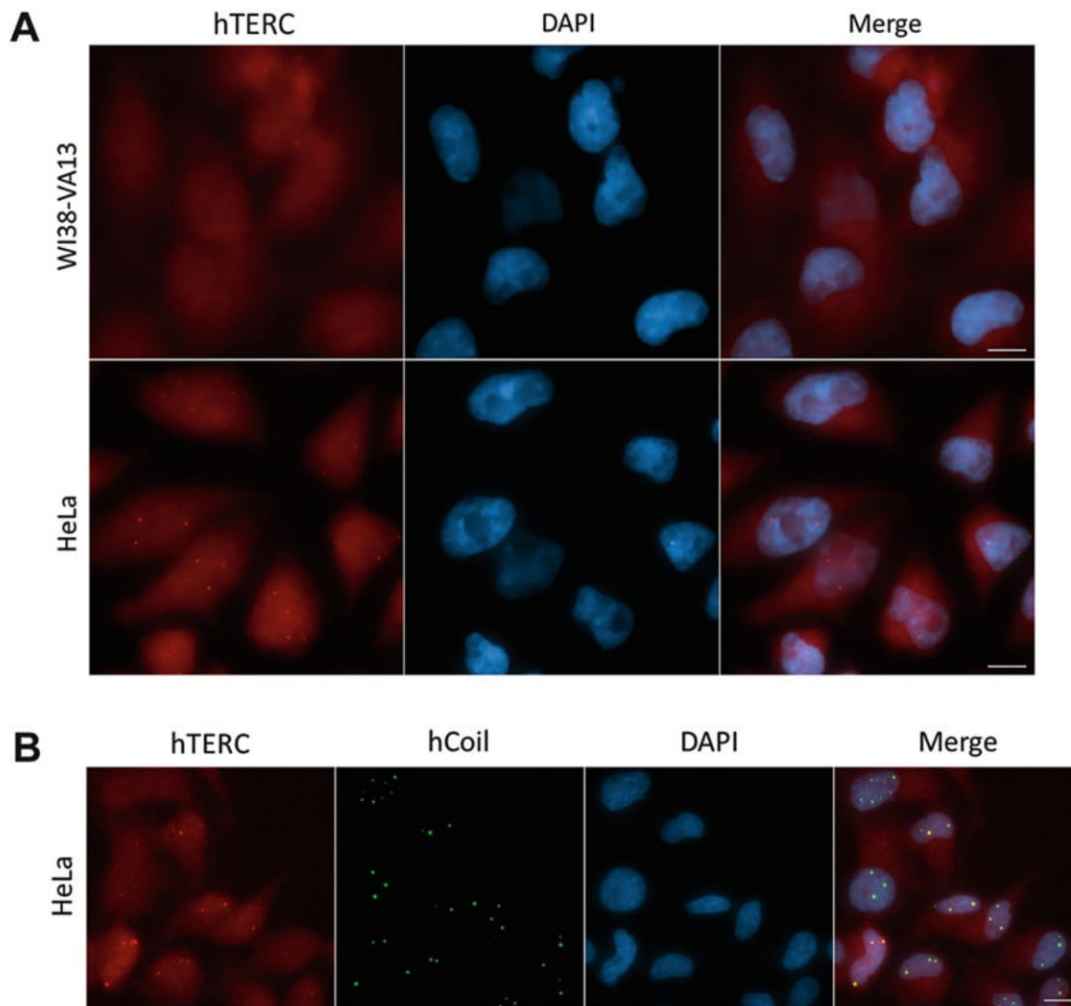


Fig. 2 FISH on human telomerase (hTERC) RNA. **(a)** HeLa cells (hTERC positive cells) and Wi38-VA13 cells (hTERC negative cells) were plated and processed for hTERC FISH, as described in this protocol. Endogenous hTERC in HeLa cells appears as foci in the nucleus. **(b)** hTERC FISH was performed on HeLa cells followed by immunofluorescence with anti-hCoilin-Alexa 647 coupled antibody (hCoil) to detect Cajal bodies. Acquisition was performed with a Zeiss upright epifluorescence microscope and Ixon EM-CCD camera. Images are maximal projections. Scale bar = 5 μ m

can be imaged using an epifluorescence or a confocal microscope (Fig. 2a). Colocalization experiments can also be performed using antibodies (to detect Coilin, as in Fig. 2b).

4 Notes

1. Formaldehyde quality is very important to preserve small details and low contrasts by FISH. We strongly recommend using EM-grade formaldehyde from Electron Microscope Science.

2. During probe purification, dropping probe solution far from the center of the G25 Sephadex column will result in the contamination of the probes with free dye molecules, leading in a false incorporation calculation. In this case, a second purification can be done with a new column.
3. When using yeast strains having the *ade2* marker, adding 20 µg/mL of adenine in the media decreases autofluorescence coming from the accumulation of phosphoribosyl-aminoimidazole, the adenine intermediate giving the pink color to *ade2* yeast colonies. For the same reason, yeast grown in YEPD medium present more autofluorescence (YEPD is poor in adenine).
4. To image simultaneously a GFP-tagged protein and the *TLCl* RNA by FISH in fixed yeast cells, grow the cells at room temperature to get a stronger GFP fluorescence. Also, spin the cells at $2500 \times g$ for 4 min and resuspend the cells in 50 mL of RNase-free PBS before adding the PFA. Keeping the pH of the yeast culture at 7.0 during fixation helps preserve the GFP fluorescence [17].
5. Spheroplasting is a step that needs to be optimized by each user. If the cell wall is not enough degraded, the probes will not diffuse inside the cells. On the other hand, if the cell wall is too much digested, the cell may lose its integrity and shape. Each reaction needs to be followed using a differential interference contrast (DIC) microscopy. Typically each 2–3 min, apply 3.5 µL of the spheroplasting reaction between a coverslip and a microscopy slide, and observe under the 20× objective. Cells that still have an intact cell wall appear brighter and have a halo around them. Cells that have a degraded cell wall lose the halo and turn darker. When more than 75% of the cells show a degradation of their cell wall, stop the spheroplasting reaction.
6. Drop the liquid carefully on the side of the well, avoiding putting it directly on the coverslip to make sure not to disperse the spheroplasts.
7. Mark the side of the Coplin jar with a marker pen to remember on which face are the spheroplasted yeasts.
8. The concentration of formamide can be adjusted to have better signal if needed. If the background is too high, the concentration of formamide can be adjusted up to 50%.
9. Avoid making bubbles to assure a uniform hybridization and make sure not to move the coverslips once laid down to avoid displacing the spheroplasts from the coverslips.
10. After this wash, a standard immunofluorescence protocol can be performed if a colocalization experiment with a protein is needed [18].

11. Mark the side of the Coplin jar with a marker pen to remember on which face are the cells.
12. Avoid making bubbles to assure a uniform hybridization and make sure not to move the coverslips once laid down to avoid displacing the cells from the coverslips.

Acknowledgments

This work was funded by a grant from the Canadian Institutes for Health Research (CHIR) MOP-89768 to P.C. M.L is supported by a fellowship from the Fonds de Recherche du Québec-Santé (FRQS). P.C holds a Research Chair from FRQS.

References

1. Schmidt JC, Cech TR (2015) Human telomerase: biogenesis, trafficking, recruitment, and activation. *Genes Dev* 29(11):1095–1105. doi:10.1101/gad.263863.115
2. Gallardo F, Olivier C, Dandjinou AT, Wellinger RJ, Chartrand P (2008) TLC1 RNA nucleo-cytoplasmic trafficking links telomerase biogenesis to its recruitment to telomeres. *EMBO J* 27:748–757
3. Wu H, Becker D, Krebber H (2014) Telomerase RNA TLC1 shuttling to the cytoplasm requires mRNA export factors and is important for telomere maintenance. *Cell Rep* 8(6):1630–1638. doi:10.1016/j.celrep.2014.08.021
4. Teixeira TM, Förstemann K, Gasser SM, Lingner J (2002) Intracellular trafficking of yeast telomerase components. *EMBO Rep* 3(7):652–659
5. Ferrezuelo F, Steiner B, Aldea M, Futcher B (2002) Biogenesis of yeast telomerase depends on the Importin Mtr10. *Mol Cell Biol* 22(17):6046–6055. doi:10.1128/mcb.22.17.6046-6055.2002
6. Pfingsten JS, Goodrich KJ, Taabazuing C, Ouenzar F, Chartrand P, Cech TR (2012) Mutually exclusive binding of telomerase RNA and DNA by Ku alters telomerase recruitment model. *Cell* 148:922–932
7. Nguyen D, Grenier St-Sauveur V, Bergeron D, Dupuis-Sandoval F, Scott Michelle S, Bachand FA (2015) Polyadenylation-dependent 3' end maturation pathway is required for the synthesis of the human telomerase RNA. *Cell Rep* 13(10):2244–2257. doi:10.1016/j.celrep.2015.11.003
8. Jady BE, Bertrand E, Kiss T (2004) Human telomerase RNA and box H/ACA scaRNAs share a common Cajal body-specific localization signal. *J Cell Biol* 164(5):647–652. doi:10.1083/jcb.200310138
9. Zhu Y, Tomlinson RL, Lukowiak AA, Terns RM, Terns MP (2004) Telomerase RNA accumulates in Cajal bodies in human cancer cells. *Mol Biol Cell* 15(1):81–90. doi:10.1091/mbc.E03-07-0525
10. Venteicher AS, Abreu EB, Meng Z, McCann KE, Terns RM, Veenstra TD, Terns MP, Artandi SE (2009) A human telomerase holoenzyme protein required for Cajal body localization and telomere synthesis. *Science* 323(5914):644–648. doi:10.1126/science.1165357
11. Gallardo F, Laterreur N, Cusanelli E, Ouenzar F, Querido E, Wellinger RJ, Chartrand P (2011) Live cell imaging of telomerase RNA dynamics reveals cell cycle-dependent clustering of telomerase at elongating telomeres. *Mol Cell* 44(5):819–827
12. Bajon E, Laterreur N, Wellinger Raymund J (2016) A single Templating RNA in yeast telomerase. *Cell Rep* 12(3):441–448. doi:10.1016/j.celrep.2015.06.045
13. Jady BE, Richard P, Bertrand E, Kiss T (2006) Cell cycle-dependent recruitment of telomerase RNA and Cajal bodies to human telomeres. *Mol Biol Cell* 17(2):944–954. doi:10.1091/mbc.E05-09-0904
14. Tomlinson RL, Abreu EB, Ziegler T, Ly H, Counter CM, Terns RM, Terns MP (2008) Telomerase reverse transcriptase is required for the localization of telomerase RNA to cajal bodies and telomeres in human cancer cells. *Mol Biol Cell* 19(9):3793–3800. doi:10.1091/mbc.E08-02-0184

15. Abreu E, Aritonovska E, Reichenbach P, Cristofari G, Culp B, Terns RM, Lingner J, Terns MP (2010) TIN2-tethered TPP1 recruits human telomerase to telomeres in vivo. *Mol Cell Biol* 30(12):2971–2982. doi:[10.1128/mcb.00240-10](https://doi.org/10.1128/mcb.00240-10)
16. Stern JL, Zyner KG, Pickett HA, Cohen SB, Bryan TM (2012) Telomerase recruitment requires both TCAB1 and Cajal bodies independently. *Mol Cell Biol* 32(13):2384–2395. doi:[10.1128/mcb.00379-12](https://doi.org/10.1128/mcb.00379-12)
17. Gallardo F, Chartrand P (2011) Visualizing mRNAs in fixed and living yeast cells. In: Gerst EJ (ed) *RNA detection and visualization: methods and protocols*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 203–219. doi:[10.1007/978-1-61779-005-8_13](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-005-8_13)
18. Chartrand P, Bertrand E, Singer RH, Long RM (2000) Sensitive and high-resolution detection of RNA in situ. *Methods Enzymol* 318:493–506

Annexe 3 – TERRA, un régulateur à plusieurs facettes de l'activité de la télomérase aux télomères

TERRA, a multifaceted regulator of telomerase activity at telomeres

Auteurs: Maxime Lalonde, Pascal Chartrand

Publié dans : Journal of Molecular Biology en 2020



TERRA, a Multifaceted Regulator of Telomerase Activity at Telomeres

Maxime Lalonde and Pascal Chartrand

Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Université de Montréal, Quebec, Canada

Correspondence to Pascal Chartrand: Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Université de Montréal, 2900 Edouard-Montpetit, Montréal, Quebec, Canada H3C 3J7. p.chartrand@umontreal.ca.

<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.02.004>

Edited by Brian Luke

Abstract

In eukaryotes, telomeres are repetitive sequences at the end of chromosomes, which are maintained in a constitutive heterochromatin state. It is now known that telomeres can be actively transcribed, leading to the production of a telomeric repeat-containing noncoding RNA called TERRA. Due to its sequence complementarity to the telomerase template, it was suggested early on that TERRA could be an inhibitor of telomerase. Since then, TERRA has been shown to be involved in heterochromatin formation at telomeres, to invade telomeric dsDNA and form R-loops, and even to promote telomerase recruitment at short telomeres. All these functions depend on the diverse capacities of this lncRNA to bind various cofactors, act as a scaffold, and promote higher-order complexes in cells. In this review, it will be highlighted as to how these properties of TERRA work together to regulate telomerase activity at telomeres.

© 2020 Published by Elsevier Ltd.

Introduction

In eukaryotes, telomeres have an essential role in protecting the ends of chromosomes from degradation, end-to-end fusion, and activation of DNA repair pathways [1]. Telomeres consist of short repeated sequences (TTAGGG in vertebrates), which span several kilobases (20–50 Kb in *Mus musculus*; 10–15 Kb in *Homo sapiens*) and terminate with a single-stranded G-rich overhang [2]. Telomeres and subtelomeric regions are particularly rich in heterochromatin marks, such as methylated histones H3 and H4 (H3K9me3, H4K20me3), bound heterochromatin protein 1 (HP1) and methylated CpG islands in mammals [3]. It is to note that the enrichment of some histone marks at telomeres is controversial, as it was also shown that telomeres are enriched with H4K20me1 and H3K27ac but not with H3K9me3 [4,5]. Even so, telomeric regions are commonly known to be transcriptionally repressive in higher eukaryotes. In budding yeast, the Sir complex (Sir1–4) is enriched at telomeres and silences transcription of subtelomeric genes, giving rise to the telomere position effect [6,7]. The discovery that telomeres are transcribed by RNA polymerase II from promo-

ters in subtelomeric regions toward the end of telomeres came as a surprise [8,9]. The product is a long noncoding RNA with telomeric repeats at its 3' end called TERRA, which has now been detected in several species besides vertebrates, such as fungi, plants, and protozoans [10–13]. These RNA molecules are heterogeneous in size and vary between 100 nt to 9 kb, display a trimethylated 5' cap, and can be polyadenylated at their 3' end [14].

The consensus is that transcription of TERRA facilitates the replication of telomeric repeats and promotes chromosome stability [15]. After transcription, TERRA can remain associated with telomeric chromatin *in cis*, although there is evidence that TERRA may act *in trans* on other telomeres [16–18]. At telomeres, TERRA forms RNA-DNA hybrids, or R-loops, which play a key role in promoting homology-directed repair at telomeres [19]. These TERRA-dependent RNA-DNA hybrids promote the maintenance of telomeres and the establishment of survivors during senescence of telomerase-negative yeast cells [20]. TERRA-mediated R-loops are also important for the maintenance of telomeres in telomerase-negative ALT cancer cells [21]. As a long noncoding RNA, TERRA also acts as a scaffold

and binds several *trans*-acting factors. As such, TERRA is involved in the local recruitment of epigenetic factors and in the establishment of heterochromatin at telomeres [22,23]. These various roles of TERRA are important since the depletion of this lncRNA using siRNAs or LNA-gapmers disrupts heterochromatin at telomeres, activates DNA damage response, and results in the accumulation of telomere dysfunction induced foci (TIFs) [18,24]. Furthermore, TIFs can also be observed in cells showing high TERRA expression, suggesting that both too high or too low TERRA expression can lead to telomeric DNA damage [25]. The *cis*-acting activities of TERRA at telomeres have been extensively reviewed and will not be further discussed here [26–28].

A significant fraction of TERRA molecules are not retained at telomeres and diffuse in the nucleoplasm. One of the functions of this soluble pool of TERRA, which is conserved between fungi and mammals, is to bind and regulate telomerase activity. We will focus in this review on the capacity of TERRA to control telomeres length homeostasis, more particularly as a regulator of telomerase activity at telomeres.

Roles for *trans*-acting TERRA: from Telomeres, to Telomeres ... and Beyond

Cell fractionation studies in fission yeast and mammalian cells have revealed that the majority of TERRA molecules are associated with chromatin [14,29]. A large proportion is likely associated with telomeres, as shown by FISH, suggesting that TERRA is mostly a *cis*-acting molecule (i.e., acting on its telomere of origin) [8,9]. However, a significant population of TERRA is not associated with chromatin but is soluble in the nucleoplasm [14]. Imaging data further support the presence of these *trans*-acting TERRA molecules by showing that not all TERRA foci are associated with telomeres [8,9], and live-cell imaging reveals the presence of highly mobile TERRA molecules in the nucleus [30,31]. TERRA can even be exported out of the nucleus in budding yeast during diauxic shift [32] or in exosomes from human lymphoblastoid cells [33], suggesting a complex regulation between TERRA retention at telomeres and cellular redistribution. Processing and maturation of TERRA may play a role in regulating its retention at telomeres. In both fission yeast and mammalian cells, the population of soluble TERRA is polyadenylated while chromatin-associated TERRA is not, suggesting that polyadenylation may be linked to the release of TERRA from telomeres [14,29]. Further evidence for a connection between RNA processing and TERRA escape from telomeres comes from studies on the THO/TREX complex, which couples transcription with pre-

mRNA processing and mRNA export [34]. The THO complex has been detected by chromatin immunoprecipitation at telomeres in budding yeast and human cells [35,36]. Deletion of the THO subunits Thp2 or Hpr1 in yeast results in increased TERRA expression and accumulation at telomeres, leading to the formation of telomeric R-loops, suggesting that the transcription and release from the chromatin of TERRA-containing ribonucleoproteins are disrupted in these mutants [35,37].

What is the function of this population of soluble TERRA? First, TERRA may interact with other genomic loci than telomeres. Indeed, CHIRT-seq on TERRA RNA in mouse cells revealed interactions between TERRA and intergenic regions of chromosomes [18,38]. TERRA could play a role in regulating gene expression by inhibiting ATRX action [18] or promoting PRC2 recruitment [38] at these loci. Besides its role in regulating gene expression, this lncRNA may also be a key factor in the maintenance of genomic integrity. In a stomach gastric adenocarcinoma (AGS) cell line, depletion of MS2-tagged TERRA expressed from a single telomere (Tel15q TERRA) with very specific anti-MS2 LNA-ASO gapmers resulted in extra-telomeric DNA damage foci [31]. These data strongly support the hypothesis that a significant fraction of TERRA is associated with chromatin outside telomeres.

TERRA as a Scaffold for Protein Complexes Acting on the Genome

The various functions of TERRA have a common feature: they depend on the capacity of this lncRNA, as frequently observed for other lncRNAs, to serve as a scaffold that recruits and organizes various *trans*-acting factors [39]. Comprehensive proteomics analyses of TERRA revealed the association of several proteins, including RNA-binding proteins, telomeric proteins, DNA replication factors and chromatin-modifying factors [18,24,40–42]. Biochemical validation has so far been done for only a few of these proteins. RNA-binding proteins, such as hnRNPA1 [43], shelterin protein TRF2 [24,44], histone chaperone ATRX [18], histone methyltransferases SUV39H1 [45] and PRC2 [23,46], or the lysine-specific demethylase LSD1 [47] are all validated partners of TERRA *in vitro* and *in vivo*. These interactions allow TERRA to modulate heterochromatin formation at telomeres [23,45], to invade telomeric dsDNA and form telomeric RNA-DNA hybrids [44], and to regulate the binding of the shelterin protein Pot1 at telomeres [48]. It remains unclear if these *trans*-acting factors are co-assembled on TERRA in the same complex or if they act in separate RNPs.

This question brings forward another property of TERRA, which is its capacity to form higher-order

complexes, which are visible as cellular aggregates or clusters. These TERRA clusters have been detected by FISH [49,50] and live-cell imaging [30,31], and this property of TERRA is conserved from budding yeast to mammalian cells [30,31,50]. Due to its G-rich sequence, TERRA telomeric repeats can form intramolecular and intermolecular parallel-stranded G-quadruplexes *in vitro* and *in vivo* [51,52]. TERRA molecules with long telomeric repeats can contain multiple intramolecular G-quadruplex blocks, arranged as “beads-on-a-string” [53]. Interactions between these G-quadruplex structures may help promote the formation of larger multimeric TERRA RNA aggregates [54]. Alternatively, RNA-binding proteins associated with TERRA may drive this aggregation. Indeed, several TERRA-associated RBPs, such as FUS [42,55], NONO and SFPQ [42], RBM14 [18], and hnRNPA1 [40,43,48] contain low complexity domains, which are known to promote liquid-liquid phase separation and RNA aggregation [56–58].

Among all these interactions and functions, one of the most studied is the role of TERRA as a regulator of telomerase. This role combines the various capacities of TERRA to act both *in cis* and *in trans*, interact with telomerase, act as a scaffold and promote higher-order complexes, which are all important properties for its role in the maintenance of telomeres.

TERRA, an Inhibitor of Telomerase in Mammalian Cells?

One of the first biological functions proposed for TERRA was that of a general inhibitor of telomerase. Indeed, since TERRA contains G-rich telomeric repeats (5'-UUAGGG-3' in mammals), it has the ability to base-pair with the template sequence of telomerase (5'-CUAACCCUAAC-3' in mammals) and inhibit the telomerase-telomere interaction [9,59]. Support for this model came from the use of short TERRA-like oligonucleotides, which inhibit telomerase activity in human and mouse cell extracts [9]. Evidence that TERRA interacts with telomerase *in vivo* came from coimmunoprecipitation experiments in human cells, which showed that TERRA is associated with both hTERT and hTR [59]. Furthermore, the *in vitro* interaction between TERRA and hTR is abolished by a mutation in the hTR template sequence, further confirming the idea that TERRA forms an inhibitory complex with telomerase. TERRA also binds hnRNPA1, an RBP associated with telomeres and which could regulate TERRA-telomerase interaction [43]. Further studies in mouse ES cells also demonstrated that TERRA copurifies with the telomerase RNA TERC [18]. The knockdown of TERRA in ESCs increases telomerase activity in an *in vitro* TRAP assay and results in

increased DNA damage at telomeres [18]. Finally, a correlation between high expression of TERRA and short telomeres in various cell lines was reported [9], further supporting the model of TERRA acting as a negative regulator of telomerase activity.

For validating this model, several studies used overexpression of TERRA in isogenic cells, to assess the impact on telomerase activity and telomere length. Surprisingly, the evidence so far shows that TERRA overexpression in mammalian cells does not inhibit telomere elongation by telomerase. Indeed, overexpression of TERRA from a transcriptionally inducible telomere does not inhibit the elongation of this telomere by telomerase [60]. On the other hand, ectopic overexpression of inducible TERRA-like transcripts in several human tumor cell lines inhibits telomerase activity, as measured in TRAP assays *in vitro* [61]. However, these TERRA-like transcripts do not reduce telomere lengths in these cells. An alternative approach to ectopic expression of TERRA or TERRA-like transcripts was to use cell lines lacking the DNA methyltransferases DNMT1 and DNMT3A/B, which results in the demethylation of the CpG elements in subtelomeric promoters and TERRA overexpression [62,63]. Using this approach, Farnung and colleagues showed that HCT116 cells lacking both DNMT1 and DNMT3B (DKO) overexpress TERRA from several telomeres, display normal telomerase activity and efficiently elongate their telomeres, suggesting that TERRA overexpression in these cells does not inhibit general telomerase activity [60]. Similar results were obtained using fibroblasts from ICF (Immunodeficiency, Centromeric region stability, and Facial anomalies) syndrome type 1 patients, which have loss-of-function mutations in the *DNMT3B* gene, leading to the hypomethylation of the CpG-rich elements in subtelomeric promoters and increased TERRA transcription [64]. Interestingly, ICF-patient-derived cells have abnormally short telomeres compared to matched fibroblasts from normal individuals [64]. Reactivation of telomerase activity in iPS cells derived from ICF fibroblasts re-establishes telomeres length, even if TERRA is overexpressed in these cells, suggesting that high TERRA expression is not enough to inhibit telomerase activity in these cells [65].

Although TERRA interacts with human and mouse telomerase, these results show that TERRA overexpression does not lead to the repression of telomerase activity *in vivo*, implying that TERRA may not act as a general inhibitor of telomerase, as originally thought. The possibility remains that TERRA may inhibit telomerase at specific moments of the cell cycle or at specific locations in the nucleus, which still need to be defined. On the other hand, studies in model organisms, notably in budding and fission yeasts, revealed another picture of TERRA-telomerase interaction, suggesting that

TERRA regulates other levels of telomerase activity in these organisms.

TERRA-telomerase Interactions in Budding Yeast

In the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the study of TERRA was initially hindered by its low level of endogenous transcription and its rapid co-transcriptional degradation by the 5'-3' exonuclease Rat1, rendering its detection, quantification, and study difficult [12]. For studying TERRA regulation and function, artificial promoters were used to induce higher transcription levels, or mutations in genes that control TERRA degradation (*RAT1*), transcription (*PAF1*, *CTR9*) or heterochromatin at telomeres (*RIF1*, *RIF2*, *SIR2*, *SIR4*, *NSE3*) were used to modulate its expression [12,66–69]. In a *rat1-1* strain, telomeres are shorter, and overexpression of RNase H in this strain rescues the telomere shortening phenotype, suggesting that TERRA/DNA hybrids may be responsible for telomere shortening in this mutant [12]. Moreover, telomere shortening in a *rat1-1* mutant is epistatic to the telomerase deletion mutant *est2Δ* [12]. Overexpression of TERRA using an inducible Galactose (GAL) or Tetracyclin (Tet) promoter inserted in a subtelomeric region also results in the shortening of the actively transcribed telomere [66,70,71]. Altogether, these results are in agreement with a role for TERRA as an inhibitor of telomerase activity at telomeres.

The relationship between telomere length and TERRA expression is not direct, however, since some mutants display high TERRA expression levels and shorter telomeres (like *paflΔ*, *ctr9Δ* or *sir4Δ*), while others like *rif1Δ* and *rif2Δ* result in increased TERRA expression, but have longer telomeres [67,69]. Furthermore, a more detailed analysis of the mechanism behind the shortening of a highly-transcribed telomere revealed that this process is telomerase-independent and is promoted by the exonuclease Exo1 [71]. This transcription-induced telomere shortening is additive with the absence of telomerase activity and promotes cellular senescence [66]. Interestingly, DNA replication is required for transcription-dependent telomere shortening, suggesting that unregulated telomeric transcription *per se*, and not TERRA accumulation, may interfere with telomere replication, leading to telomere shortening [66].

For circumventing the possible unintended effects that TERRA overexpression can have on telomere maintenance in budding yeast, imaging approaches have been used to detect endogenous TERRA expression and its interplay with telomeres [50,72]. Telomere-specific TERRA RNA FISH revealed that TERRA from telomeres, such as 1L, 6R, or with Y' element, can escape transcriptional repression and

Rat1-dependent degradation to accumulate into a discrete perinuclear focus in ~15–28% of cells at a given time. RNA FISH to detect TERRA expressed from these two telomeres found that they were rarely detected in the same cell, suggesting that simultaneous expression of TERRA from different telomeres may be rare. The percentage of cells expressing TERRA from a single telomere was confirmed by RNA live-cell imaging, using endogenous MS2-tagged TERRA expressed from telomeres 1L and 6R, showing that 10% of the yeast cells had a nuclear TERRA cluster. These results raised the question of why these cells express TERRA from these specific telomeres. One possibility is that TERRA-expressing telomeres are very short in these cells, leading to transcriptional activation at telomeres. Indeed, a *tlc1Δ* strain revealed that general telomere shortening results in increased TERRA expression from all telomeres tested. These results were confirmed using a single telomere inducible shortening system, which reinforced the link between telomere shortening and TERRA expression [50,73].

To further characterize the interplay between TERRA and telomeres, dual-color imaging of TERRA and telomeres was performed in living cells. Imaging MS2-tagged TERRA with the telomeric protein Rap1-mCherry revealed that TERRA foci are not stably associated with telomeres but are more freely diffusive in the nucleoplasm [50]. To determine if TERRA associated more with its telomere of origin, a single telomere was labeled using a tetO array combined with TetR-RFP. This approach revealed that, during a 30 min time course acquisition, 70% of the time, TERRA expressed from a specific telomere colocalized at one point with its telomere of origin while only in 9% the TERRA foci colocalize with another telomere. The preferential association of TERRA with its telomere of origin in the S phase was further confirmed by chromatin immunoprecipitation experiments. Interestingly, TERRA was found to interact with the telomerase RNA *TLC1* by reciprocal co-immunoprecipitation of MS2-tagged TERRA with *TLC1* RNA. This interaction was validated by imaging using PP7-tagged TERRA expressed from Telomere 6R (Tel6R-TERRA) and MS2-tagged *TLC1* RNA, which showed that over 90% of the Tel6R-TERRA foci colocalized with telomerase *TLC1* RNA [50].

TERRA as a Scaffold for Telomerase Clustering in Budding Yeast

Telomerase RNA in budding yeast (*TLC1*) has been previously imaged by RNA FISH [74–77] and MS2-based live-cell imaging [72,78]. Since the *TLC1* RNA acts as the scaffold for telomerase RNP assembly and is the limiting component of the

yeast telomerase holoenzyme [79,80], it constitutes an excellent proxy to study telomerase RNP dynamics in budding yeast cells. These studies revealed a complex regulation of telomerase nucleocytoplasmic trafficking linked to telomerase biogenesis [76,81,82], nuclear retention [83], RNP stoichiometry [77], cell cycle regulation and DNA repair [84]. More surprising was the observation that *TLC1* RNA accumulates into clusters named T-Recs (Telomerase Recruitment Cluster) in late S-phase cells [72,78]. Based on the size and total fluorescence of T-Recs, it was estimated that between 6 and 15 *TLC1* RNA molecules accumulate in the same cluster. Particle dynamics studies and genetic analyses led to the conclusion that these clusters represent telomere-associated telomerase molecules. The finding that the deletion of telomerase recruitment factors impacts the number of T-Recs led to the hypothesis that T-Recs represent a way for cells to concentrate and target telomerase activity to short telomeres [78]. However, a question remained:

what triggers this clustering of telomerase molecules in the S phase?

Simultaneous imaging, in living yeast cells, of fluorescent-labeled, MS2-tagged *TLC1* RNA, and PP7-labeled TERRA led to new insights. Dual-camera time-lapse acquisitions revealed the nucleation of *TLC1* RNA molecules onto a TERRA focus, to form a T-Recs in S-phase cells [50] (Fig. 1). Following T-Recs formation, the *TLC1*-TERRA complex relocates to the telomere of origin of the PP7-labeled TERRA, which is a short telomere. While it is possible that TERRA may help target telomerase to its telomere of origin through RNA-DNA binding [85], it is more likely that the recruitment of the TERRA-telomerase complex on telomeres depends on the Cdc13-Est1 interaction and the telomerase recruitment pathway [6]. This pathway requires genes involved in the processing of short telomeres (*MRE11*, *XRS2*, *RAD50*, *TEL1*) [86–88] and in the interaction between telomerase and short telomeres (*EST1*, *CDC13*, *YKU70*) [89,90]. Indeed,

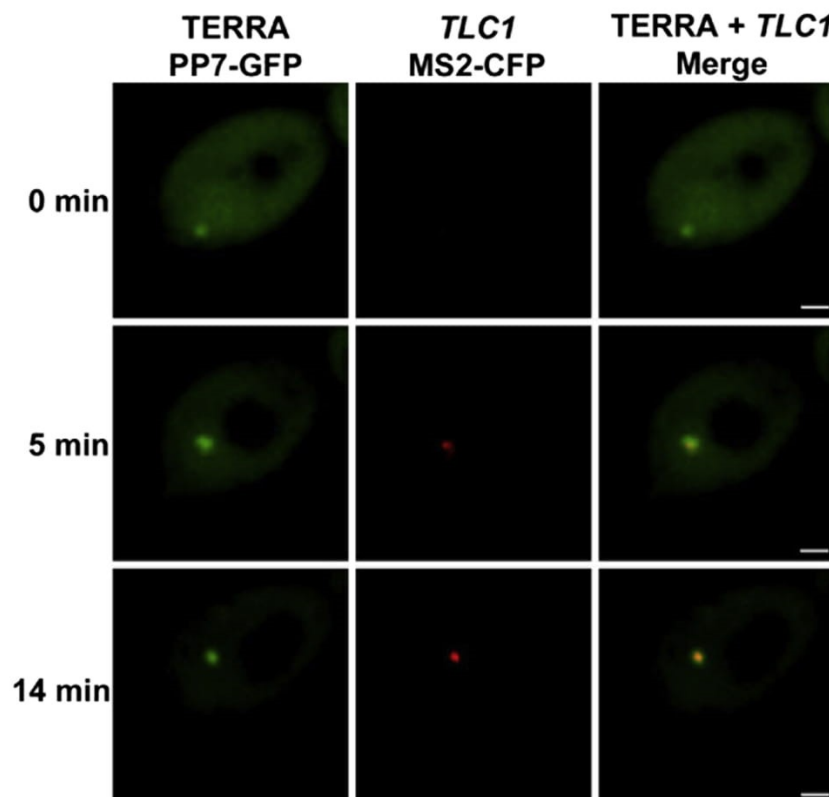


Fig. 1. Clustering of telomerase RNA molecules on TERRA focus in *Saccharomyces cerevisiae*. A TERRA focus acts as a seed for nucleation of a *TLC1* RNA cluster. Confocal microscopy images of *TLC1*-MS2-CFP and Tel6R-TERRA-PP7-GFP at indicated time points. Tel6R-TERRA-GFP and *TLC1*-CFP were monitored over time by performing sequential two color acquisitions. The *TLC1*-CFP focus (in red) appears directly over the Tel6R-TERRA-GFP focus (in green) over time. Scale bar: 1 μ m. Figure reproduced with permission from Ref. [50].

yeast strains, such as *yku70Δ*, *mre11Δ*, and *tel1Δ*, show a 3 to 4-fold reduction in TERRA foci colocalization with its telomere of origin [50]. Similarly, T-Recs accumulation is hindered in mutants of telomerase recruitment pathway (*cdc13-2*, *tel1Δ*, *xrs2Δ*) [78].

These results led to the model that TERRA may act as a scaffold that recruits and concentrates telomerase molecules into a single cluster (Fig. 2). The scaffolding of a complex to concentrate enzymatic activity is reminiscent of liquid-liquid phase

separation and is a key activity of several noncoding RNAs that induce the concentration of *trans*-acting factors into nuclear membraneless organelles, such as paraspeckles, Cajal bodies and the nucleolus [91,92]. Why budding yeast telomerase requires the concentration of several catalytic units into a unique complex remains unclear. One possible explanation is that, unlike its human counterpart, the budding yeast telomerase features limited repeat addition processivity *in vitro* [93]. However, *in vivo*, budding yeast telomerase repeat addition processivity is

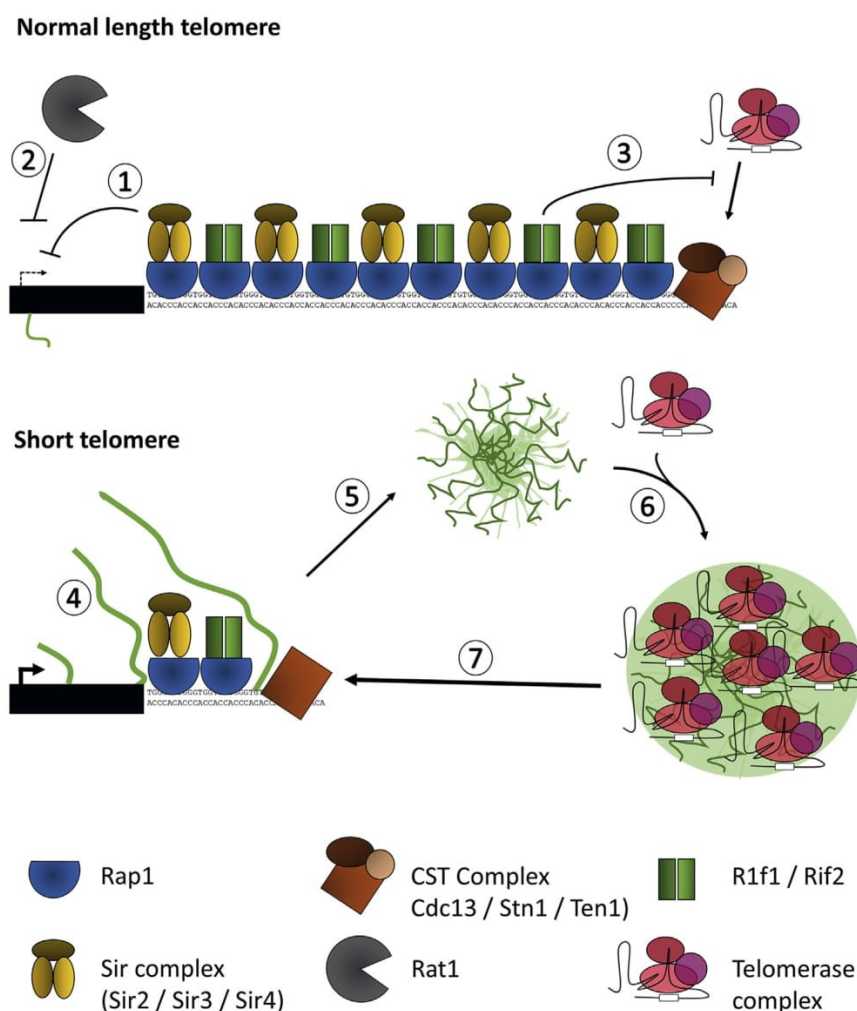


Fig. 2. TERRA-induced telomerase clustering and recruitment at short telomere in *Saccharomyces cerevisiae*. At normal telomeres (top), TERRA RNA expression is low due to transcriptional repression by the Sir complex (1) and by Rat1-dependent degradation (2). Telomerase recruitment to the telomere end is inhibited by the R1f1 and R1f2 proteins (3). When a telomere is critically short (bottom), the repression of TERRA expression is alleviated (4). TERRA then forms a higher order complex (5), which serves as a scaffold to concentrate telomerase complexes in a foci called T-Recs (6). T-Recs is then directed to critically short telomeres by the telomerase recruitment pathway and interaction between Cdc13 and the telomerase subunit Est1 (7).

increased at very short telomeres, and over 100 nucleotides can be added to a telomere during a single cell cycle [94,95]. One way for a poorly processive enzyme to achieve such activity *in vivo* may be to shift to a distributive mode via the recruitment of several telomerase molecules on a very short telomere. We can speculate that the formation of a T-Recs may represent one way to achieve such high local concentration of telomerase molecules, for an enzyme, which is present at only 10–30 copies per cell [79]. Therefore, the expression of TERRA from a short telomere may help trigger this local concentration of telomerase, which will act to efficiently extend the short telomere. It remains unclear how TERRA nucleates telomerase and which partners mediate this interaction. The recent discovery of novel proteins associated with the telomerase holoenzyme in budding yeast may help shed some light on the formation of this higher-order complex [96,97].

TERRA Promotes Telomerase-telomere Interaction in Fission Yeast

Another important step toward understanding the complex relationship between TERRA and telomerase came from studies in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, which revealed the importance of the various subpopulations of TERRA RNAs. Indeed, in *S. pombe*, telomeres are transcribed to produce various noncoding RNAs. Joining TERRA as telomeric transcripts are ARIA, ARRET, and α ARRET, which represent, respectively, a C-rich RNA composed uniquely of telomeric repeats and two antiparallel RNAs arising from the subtelomeric regions and devoid of telomeric repeats [11,98,99]. These different products of telomeric transcription have been shown to be differentially regulated, since all these ncRNAs were increased when telomeres were perturbed by deletion of telomeric proteins Rap1 and Taz1 (orthologues of TRF1/TRF2), but only ARRET and α ARRET were affected by deletion of heterochromatin factors, such as Swi6 and Clr4 [11,98,99]. This suggests that the transcriptome of telomeres might be more complicated than predicted, and subpopulations of ncRNAs with distinct functions might be produced under different transcriptional regulations. Furthermore, while ARRET and α ARRET are fully polyadenylated, the percentage of polyA + TERRA RNA is only 7–10% [11].

While investigating the link between TERRA and telomerase in fission yeast, the Azzalin lab confirmed that TERRA is polyadenylated in a small proportion similar to that of mammalian TERRA RNA

[29,100]. While telomere shortening induced by telomerase deletion increases both polyadenylated and nonpolyadenylated forms of TERRA, there is no effect on the levels of ARRET and α ARRET. The higher levels of TERRA induced by telomere shortening allowed the characterization of the 3' end of TERRA, which revealed that two subpopulations exist in the cell: G-rich TERRA, which has a long telomeric sequence tract but is not polyadenylated; and polyA + TERRA, which has subtelomeric sequences and short telomeric repeats and is polyadenylated. Nuclear fractionation revealed that G-rich TERRA is enriched in the chromatin fraction, pointing toward a *cis*-acting role. On the other hand, polyA + TERRA was enriched in the nucleoplasmic fraction, coherent with findings in human cells [14]. In addition, polyA + TERRA, but not G-rich TERRA, can be immunoprecipitated with telomerase RNA (TER1) and catalytic subunit Trt1, confirming that the two pools of TERRA have different localizations and functions. Interestingly, TER1 is dispensable for the interaction between TERRA and Trt1, suggesting that the TERRA-telomerase interaction may not be mediated by base-pairing with the template sequence of telomerase, as it was initially thought [9,59]. These results were also confirmed by the introduction of an inducible promoter to mimic the enhanced expression of TERRA produced by telomere shortening. This inducible system revealed that transcription of TERRA promotes telomere lengthening in a telomerase-dependent manner in fission yeast [29]. In these conditions, TERRA increases the association of telomerase with transcribed telomeres, as showed by chromatin immunoprecipitation.

Altogether, these results provide evidence for an interaction between TERRA and telomerase in *S. pombe* and suggest a role for TERRA as a positive regulator of telomerase-mediated telomere lengthening (Fig. 3). How TERRA stimulates telomerase activity at telomeres remains unsettled. On the one side, active transcription of TERRA at short telomeres may promote the formation of a telomeric “open state,” which favors the recruitment of telomerase [29]. On the other side, the association of soluble polyA + TERRA with telomerase increases its interaction with telomeres. Since fission yeast telomerase also displays poor processivity *in vitro*, it is possible that polyA + TERRA also promotes telomerase clustering at short telomeres, as it was reported to do in budding yeast [50,101]. The reason as to why only TERRA with short telomeric tracts associated with telomerase is still not known, but these results raise the importance of TERRA 3' end processing in modulating its function [102].

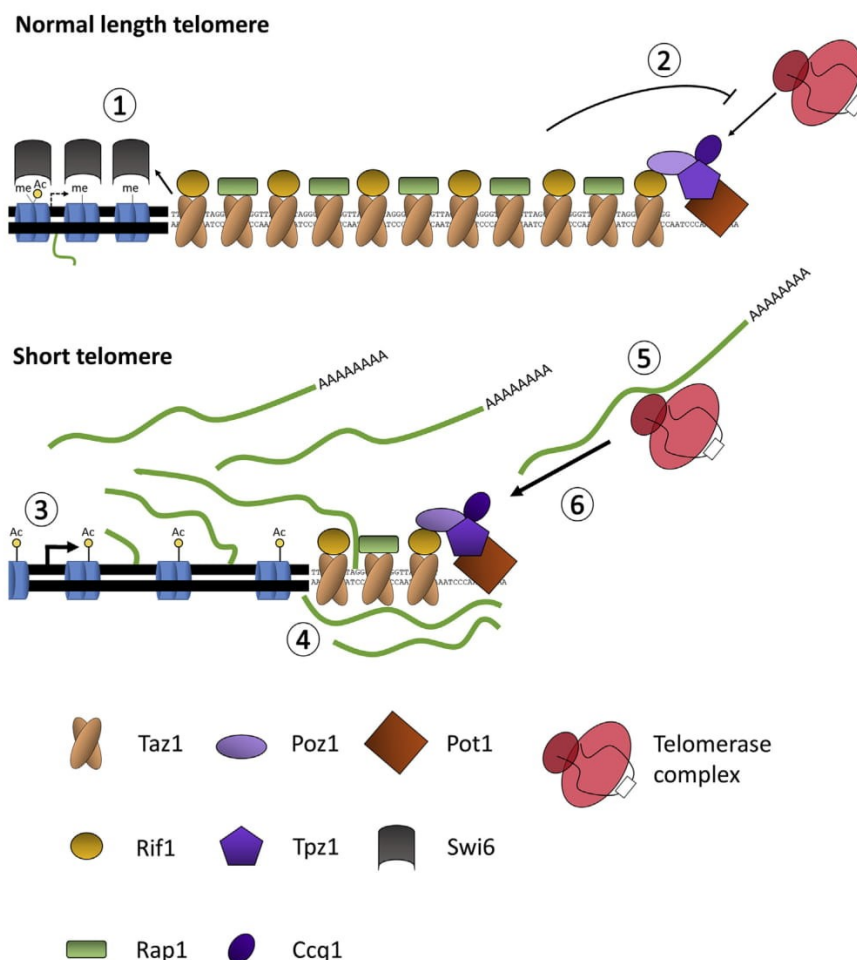


Fig. 3. Model for the roles of G-rich TERRA and polyA + TERRA in telomerase regulation in *Schizosaccharomyces pombe*. At telomeres with normal length (top), TERRA transcription is normally inhibited in the subtelomeric region by the methylated H3K9 binding protein Swi6 and the deacetylation of H3K9 (1). Telomeric proteins, such as Taz1 and Rap1, inhibit telomerase recruitment to telomeres (2). When telomeres are short (bottom), demethylation, and acetylation of histones open the chromatin and allow TERRA transcription (3). G-Rich TERRA stays on the chromatin and potentially plays a role *in cis* in telomere protection and in telomerase regulation (4). PolyA + TERRA is released from the chromatin and can interact with telomerase (5). This interaction contributes to telomerase recruitment to telomeres (6).

Conclusion

TERRA is now emerging as a key regulator of telomere maintenance and heterochromatin formation at telomeres. Studies on TERRA-telomerase interactions revealed that TERRA is a truly multifaceted lncRNA and can use different properties to control telomerase activity. Still, several questions remain regarding how TERRA interacts with telomerase, what is the role of the telomeric repeats in this interaction and why different species use this lncRNA for opposite functions. Furthermore, current data show that different subpopulations of TERRA

coexist, which have specific localizations, bind distinct cofactors, and probably have different roles in the cell. These subpopulations of TERRA may provide some explanation of why this lncRNA can act either as an inhibitor or as an activator of telomerase. This could also explain why in certain cases, high TERRA levels correlate with shorter telomeres, and in some cases, with longer telomeres. This underlines the importance to better characterize, which subpopulation of TERRA is affected (i.e., polyA + or polyA-) when changes in TERRA expression level are detected. Greater knowledge on TERRA is therefore required for a

fundamental understanding of telomerase regulation during cellular immortalization and in cancers.

Acknowledgements

We thank E. Querido for comments on the manuscript. The authors acknowledge financial support from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-89768 and PJT-162156). ML is supported by a fellowship from the Fonds de Recherche du Québec-Santé (FRQS). PC holds a Research Chair from the FRQS.

Declaration of interest

None.

Received 29 October 2019;

Received in revised form 6 February 2020;

Accepted 10 February 2020

Available online xxxx

Keywords:

TERRA;
lncRNA;
telomerase;
telomeres

Abbreviations used:

TERRA, telomeric repeat-containing RNA; lncRNA, long noncoding RNA; TIFs, telomeres dysfunction induced foci;

ALT, alternative lengthening of telomeres; CHIRT-seq, Chromatin isolation by purification of RNA targets; RBP, RNA-binding protein; ESCs, embryonic stem cells; FISH,

Fluorescent in situ Hybridization; LNA-ASO, locked nucleic acid antisense oligonucleotide; siRNAs, small interfering RNAs; TRAP, telomeric repeat amplification protocol; RNP, ribonucleoprotein; T-Recs, telomerase recruitment cluster.

References

- [1] T. de Lange, Shelterin-mediated telomere protection, *Annu. Rev. Genet.* 52 (2018) 223–247.
- [2] W. Palm, T. de Lange, How shelterin protects mammalian telomeres, *Annu. Rev. Genet.* 42 (2008) 301–334.
- [3] G. Nishibuchi, J. Déjardin, The molecular basis of the organization of repetitive DNA-containing constitutive heterochromatin in mammals, *Chromosome Res.* 25 (2017) 77–87.
- [4] M.D. Cubiles, S. Barroso, M.I. Vaquero-Sedas, A. Enguix, A. Aguilera, M.A. Vega-Palas, Epigenetic features of human telomeres, *Nucleic Acids Res.* 46 (2018) 2347–2355.
- [5] I. Udrouiu, A. Sgura, Alternative lengthening of telomeres and chromatin status, *Genes (Basel)* 11 (2019).
- [6] R.J. Wellinger, V.A. Zakian, Everything you ever wanted to know about *Saccharomyces cerevisiae* telomeres: beginning to end, *Genetics* 191 (2012) 1073–1105.
- [7] S. Kueng, M. Oppikofer, S.M. Gasser, SIR proteins and the assembly of silent chromatin in budding yeast, *Annu. Rev. Genet.* 47 (2013) 275–306.
- [8] C.M. Azzalin, P. Reichenbach, L. Khoraiuli, E. Giulotto, J. Lingner, Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends, *Science* 318 (2007) 798–801.
- [9] S. Schoeftner, M.A. Blasco, Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II, *Nat. Cell Biol.* 10 (2008) 228–236.
- [10] J. Vrbsky, S. Akimcheva, J.M. Watson, T.L. Turner, L. Daxinger, B. Vyskot, et al., siRNA-mediated methylation of *Arabidopsis* telomeres, *PLoS Genet.* 6 (2010), e1000986.
- [11] A. Bah, H. Wischniewski, V. Shchepachev, C.M. Azzalin, The telomeric transcriptome of *Schizosaccharomyces pombe*, *Nucleic Acids Res.* 40 (2012) 2995–3005.
- [12] B. Luke, A. Panza, S. Redon, N. Iglesias, Z. Li, J. Lingner, The Rat1p 5' to 3' exonuclease degrades telomeric repeat-containing RNA and promotes telomere elongation in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell* 32 (2008) 465–477.
- [13] K.M. Broadbent, D. Park, A.R. Wolf, D. Van Tyne, J.S. Sims, U. Ribacke, et al., A global transcriptional analysis of *Plasmodium falciparum* malaria reveals a novel family of telomere-associated lncRNAs, *Genome Biol.* 12 (2011) R56.
- [14] A. Porro, S. Feuerhahn, P. Reichenbach, J. Lingner, Molecular dissection of telomeric repeat-containing RNA biogenesis unveils the presence of distinct and multiple regulatory pathways, *Mol. Cell Biol.* 30 (2010) 4808–4817.
- [15] K. Beishline, O. Vladimirova, S. Tutton, Z. Wang, Z. Deng, P.M. Lieberman, CTCF driven TERRA transcription facilitates completion of telomere DNA replication, *Nat. Commun.* 8 (2017) 2114.
- [16] I.L. de Silanes, O. Graña, M.L. De Bonis, O. Dominguez, D.G. Pisano, M.A. Blasco, Identification of TERRA locus unveils a telomere protection role through association to nearly all chromosomes, *Nat. Commun.* 5 (2014) 4723.
- [17] J.J. Montero, I. López de Silanes, O. Graña, M.A. Blasco, Telomeric RNAs are essential to maintain telomeres, *Nat. Commun.* 7 (2016) 12534.
- [18] H.-P. Chu, C. Cifuentes-Rojas, B. Kesner, E. Aeby, H.-g Lee, C. Wei, et al., TERRA RNA antagonizes ATRX and protects telomeres, *Cell* 170 (2017), 86–101.e16.
- [19] S. Toubiana, S. Selig, DNA:RNA hybrids at telomeres – when it is better to be out of the (R) loop, *FEBS J.* 285 (2018) 2552–2566.
- [20] B. Balk, A. Maicher, M. Dees, J. Klermund, S. Luke-Glaser, K. Bender, et al., Telomeric RNA-DNA hybrids affect telomere-length dynamics and senescence, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20 (2013) 1199–1205.
- [21] R. Arora, Y. Lee, H. Wischniewski, C.M. Brun, T. Schwarz, C.M. Azzalin, RNaseH1 regulates TERRA-telomeric DNA hybrids and telomere maintenance in ALT tumour cells, *Nat. Commun.* 5 (2014) 5220.

- [22] N. Arnoult, A. Van Beneden, A. Decottignies, Telomere length regulates TERRA levels through increased trimethylation of telomeric H3K9 and HP1 α , *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19 (2012) 948–956.
- [23] J.J. Montero, I. López-Silanes, D. Megías, F. Fraga M, Castells-García Á, M.A. Blasco, TERRA recruitment of polycomb to telomeres is essential for histone trimethylation marks at telomeric heterochromatin, *Nat. Commun.* 9 (2018) 1548.
- [24] Z. Deng, J. Norseen, A. Wiedmer, H. Riethman, P.M. Lieberman, TERRA RNA binding to TRF2 facilitates heterochromatin formation and ORC recruitment at telomeres, *Mol. Cell* 35 (2009) 403–413.
- [25] S. Sagie, S. Toubiana, S.R. Hartono, H. Katzir, A. Tzur-Gilat, S. Havazelet, et al., Telomeres in ICF syndrome cells are vulnerable to DNA damage due to elevated DNA:RNA hybrids, *Nat. Commun.* 8 (2017) 14015.
- [26] K. Rippe, B. Luke, TERRA and the state of the telomere, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 22 (2015) 853.
- [27] E. Cusanelli, P. Chartrand, Telomeric repeat-containing RNA TERRA: a noncoding RNA connecting telomere biology to genome integrity, *Front. Genet.* 6 (2015).
- [28] N. Bettin, C. Oss Pegoraro, E. Cusanelli, The emerging roles of TERRA in telomere maintenance and genome stability, *Cells* 8 (2019) 246.
- [29] M. Moravec, H. Wischniewski, A. Bah, Y. Hu, N. Liu, L. Lafranchi, et al., TERRA promotes telomerase-mediated telomere elongation in *Schizosaccharomyces pombe*, *EMBO Rep.* 17 (2016) 999–1012.
- [30] T. Yamada, H. Yoshimura, R. Shimada, M. Hattori, M. Eguchi, T.K. Fujiwara, et al., Spatiotemporal analysis with a genetically encoded fluorescent RNA probe reveals TERRA function around telomeres, *Sci. Rep.* 6 (2016) 38910.
- [31] L. Avogaro, E. Querido, M. Dalachi, M.F. Jantsch, P. Chartrand, E. Cusanelli, Live-cell imaging reveals the dynamics and function of single-telomere TERRA molecules in cancer cells, *RNA Biol.* 15 (2018) 787–796.
- [32] C.A. Perez-Romero, M. Lalonde, P. Chartrand, E. Cusanelli, Induction and relocalization of telomeric repeat-containing RNAs during diauxic shift in budding yeast, *Curr. Genet.* 64 (2018) 1117–1127.
- [33] Z. Wang, Z. Deng, N. Dahmane, K. Tsai, P. Wang, D.R. Williams, et al., Telomeric repeat-containing RNA (TERRA) constitutes a nucleoprotein component of extracellular inflammatory exosomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112 (2015) E6293–E6300.
- [34] C.G. Heath, N. Viphakone, S.A. Wilson, The role of TREX in gene expression and disease, *Biochem. J.* 473 (2016) 2911–2935.
- [35] V. Pfeiffer, J. Crittin, L. Grolimund, J. Lingner, The THO complex component Thp2 counteracts telomeric R-loops and telomere shortening, *EMBO J.* 32 (2013) 2861–2871.
- [36] L. Grolimund, E. Aeby, R. Hamelin, F. Armand, D. Chiappe, M. Moniatte, et al., A quantitative telomeric chromatin isolation protocol identifies different telomeric states, *Nat. Commun.* 4 (2013) 2848.
- [37] T.-Y. Yu, Y.-w. Kao, J.-J. Lin, Telomeric transcripts stimulate telomere recombination to suppress senescence in cells lacking telomerase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111 (2014) 3377–3382.
- [38] R.M. Marión, J.J. Montero, I. López de Silanes, O. Graña-Castro, P. Martínez, S. Schoeftner, et al., TERRA regulate the transcriptional landscape of pluripotent cells through TRF1-dependent recruitment of PRC2, *eLife* 8 (2019), e44656.
- [39] J.L. Rinn, H.Y. Chang, Genome regulation by long noncoding RNAs, *Annu. Rev. Biochem.* 81 (2012) 145–166.
- [40] I.L. de Silanes, M.S. d'Alcontres, M.A. Blasco, TERRA transcripts are bound by a complex array of RNA-binding proteins, *Nat. Commun.* 1 (2010) 33.
- [41] M. Scheibe, N. Arnoult, D. Kappei, F. Buchholz, A. Decottignies, F. Butter, et al., Quantitative interaction screen of telomeric repeat-containing RNA reveals novel TERRA regulators, *Genome Res.* 23 (2013) 2149–2157.
- [42] E. Petti, V. Buemi, A. Zappone, O. Schillaci, P.V. Broccia, R. Dinami, et al., SFPQ and NONO suppress RNA:DNA-hybrid-related telomere instability, *Nat. Commun.* 10 (2019) 1001.
- [43] S. Redon, I. Zemp, J. Lingner, A three-state model for the regulation of telomerase by TERRA and hnRNP1, *Nucleic Acids Res.* 41 (2013) 9117–9128.
- [44] Y.W. Lee, R. Arora, H. Wischniewski, C.M. Azzalin, TRF1 participates in chromosome end protection by averting TRF2-dependent telomeric R loops, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 25 (2018) 147–153.
- [45] A. Porro, S. Feuerhahn, J. Delafontaine, H. Riethman, J. Rougemont, J. Lingner, Functional characterization of the TERRA transcriptome at damaged telomeres, *Nat. Commun.* 5 (2014) 5379.
- [46] X. Wang, K.J. Goodrich, A.R. Gooding, H. Naeem, S. Archer, R.D. Paucek, et al., Targeting of polycomb repressive complex 2 to RNA by short repeats of consecutive guanines, *Mol. Cell* 65 (2017) 1056–1067, e5.
- [47] A. Porro, S. Feuerhahn, J. Lingner, TERRA-reinforced association of LSD1 with MRE11 promotes processing of uncapped telomeres, *Cell Rep.* 6 (2014) 765–776.
- [48] R.L. Flynn, R.C. Centore, R.J. O'Sullivan, R. Rai, A. Tse, Z. Songyang, et al., TERRA and hnRNP1 orchestrate an RPA-to-POT1 switch on telomeric single-stranded DNA, *Nature* 471 (2011) 532–536.
- [49] Z. Deng, Z. Wang, C. Xiang, A. Molczan, V. Baubet, J. Conejo-Garcia, et al., Formation of telomeric repeat-containing RNA (TERRA) foci in highly proliferating mouse cerebellar neuronal progenitors and medulloblastoma, *J. Cell Sci.* 125 (2012) 4383–4394.
- [50] E. Cusanelli, C.A.P. Romero, P. Chartrand, Telomeric noncoding RNA TERRA is induced by telomere shortening to nucleate telomerase molecules at short telomeres, *Mol. Cell* 51 (2013) 780–791.
- [51] Y. Xu, Y. Suzuki, K. Ito, M. Komiyama, Telomeric repeat-containing RNA structure in living cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107 (2010) 14579–14584.
- [52] G.W. Collie, S.M. Haider, S. Neidle, G.N. Parkinson, A crystallographic and modelling study of a human telomeric RNA (TERRA) quadruplex, *Nucleic Acids Res.* 38 (2010) 5569–5580.
- [53] H. Martadinata, B. Heddi, K.W. Lim, A.T. Phan, Structure of long human telomeric RNA (TERRA): G-quadruplexes formed by four and eight UUAGGG repeats are stable building blocks, *Biochemistry* 50 (2011) 6455–6461.
- [54] G.W. Collie, G.N. Parkinson, S. Neidle, F. Rosu, E. De Pauw, V. Gabelica, Electrospray mass spectrometry of telomeric RNA (TERRA) reveals the formation of stable multimeric G-quadruplex structures, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 9328–9334.

- [55] X. Wang, J.C. Schwartz, T.R. Cech, Nucleic acid-binding specificity of human FUS protein, *Nucleic Acids Res.* 43 (2015) 7535–7543.
- [56] T. Yamazaki, S. Souquere, T. Chujo, S. Kobelke, Y.S. Chong, A.H. Fox, et al., Functional domains of NEAT1 architectural lncRNA induce paraspeckle assembly through phase separation, *Mol. Cell* 70 (2018), 1038–1053.e7.
- [57] A. Patel, O. Lee Hyun, L. Jawerth, S. Maharana, M. Jahnel, Y. Hein Marco, et al., A liquid-to-solid phase transition of the ALS protein FUS accelerated by disease mutation, *Cell* 162 (2015) 1066–1077.
- [58] Y. Lin, S.W. Protter David, K. Rosen Michael, R. Parker, Formation and maturation of phase-separated liquid droplets by RNA-binding proteins, *Mol. Cell* 60 (2015) 208–219.
- [59] S. Redon, P. Reichenbach, J. Lingner, The non-coding RNA TERRA is a natural ligand and direct inhibitor of human telomerase, *Nucleic Acids Res.* 38 (2010) 5797–5806.
- [60] B.O. Farnung, C.M. Brun, R. Arora, L.E. Lorenzi, C.M. Azzalin, Telomerase efficiently elongates highly transcribing telomeres in human cancer cells, *PLoS One* 7 (2012), e35714.
- [61] T. Kreilmeier, D. Mejri, M. Hauck, M. Kleiter, K. Holzmann, Telomere transcripts target telomerase in human cancer cells, *Genes* 7 (2016) 46.
- [62] S.G. Nergadze, B.O. Farnung, H. Wischnewski, L. Khorauli, V. Vitelli, R. Chawla, et al., CpG-island promoters drive transcription of human telomeres, *RNA* 15 (2009) 2186–2194.
- [63] M. Feretzaki, P. Renck Nunes, J. Lingner, Expression and differential regulation of human TERRA at several chromosome ends, *RNA* 25 (2019) 1470–1480.
- [64] S. Yehezkel, Y. Segev, E. Viegas-Péquignot, K. Skorecki, S. Selig, Hypomethylation of subtelomeric regions in ICF syndrome is associated with abnormally short telomeres and enhanced transcription from telomeric regions, *Hum. Mol. Genet.* 17 (2008) 2776–2789.
- [65] S. Sagie, E. Ellran, H. Katzir, R. Shaked, S. Yehezkel, I. Laevsky, et al., Induced pluripotent stem cells as a model for telomeric abnormalities in ICF type I syndrome, *Hum. Mol. Genet.* 23 (2014) 3629–3640.
- [66] A. Maicher, L. Kastner, M. Dees, B. Luke, Deregulated telomere transcription causes replication-dependent telomere shortening and promotes cellular senescence, *Nucleic Acids Res.* 40 (2012) 6649–6659.
- [67] N. Iglesias, S. Redon, V. Pfeiffer, M. Dees, J. Lingner, B. Luke, Subtelomeric repetitive elements determine TERRA regulation by Rap1/Rif and Rap1/Sir complexes in yeast, *EMBO Rep.* 12 (2011) 587–593.
- [68] S. Moradi-Fard, J. Sarthi, M. Tittel-Elmer, M. Lalonde, E. Cusanelli, P. Chartrand, et al., Smc5/6 is a telomere-associated complex that regulates Sir4 binding and TPE, *PLoS Genet.* 12 (2016), e1006268.
- [69] J. Rodrigues, D. Lydall, Paf1 and Ctr9, core components of the PAF1 complex, maintain low levels of telomeric repeat containing RNA, *Nucleic Acids Res.* 46 (2017) 621–634.
- [70] L.L. Sandell, D.E. Gottschling, V.A. Zakian, Transcription of a yeast telomere alleviates telomere position effect without affecting chromosome stability, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91 (1994) 12061–12065.
- [71] V. Pfeiffer, J. Lingner, TERRA promotes telomere shortening through exonuclease 1-mediated resection of chromosome ends, *PLoS Genet.* 8 (2012), e1002747.
- [72] H. Laprade, M. Lalonde, D. Guérit, P. Chartrand, Live-cell imaging of budding yeast telomerase RNA and TERRA, *Methods* 114 (2017) 46–53.
- [73] M. Graf, D. Bonetti, A. Lockhart, K. Serhal, V. Kellner, A. Maicher, et al., Telomere length determines TERRA and R-loop regulation through the cell cycle, *Cell* 170 (2017) 72–85, e14.
- [74] F. Ferrezuelo, B. Steiner, M. Aldea, B. Fletcher, Biogenesis of yeast telomerase depends on the importin Mtr10, *Mol. Cell Biol.* 22 (2002) 6046–6055.
- [75] T.M. Teixeira, K. Förstemann, S.M. Gasser, J. Lingner, Intracellular trafficking of yeast telomerase components, *EMBO Rep.* 3 (2002) 652–659.
- [76] F. Gallardo, C. Olivier, A.T. Dandjinou, R.J. Wellinger, P. Chartrand, TLC1 RNA nucleocytoplasmic trafficking links telomerase biogenesis to its recruitment to telomeres, *EMBO J.* 27 (2008) 748–757.
- [77] E. Bajon, N. Laterreur, J. Wellinger Raymund, A single templating RNA in yeast telomerase, *Cell Rep.* 12 (2015) 441–448.
- [78] F. Gallardo, N. Laterreur, E. Cusanelli, F. Ouenzar, E. Querido, R.J. Wellinger, et al., Live cell imaging of telomerase RNA dynamics reveals cell cycle-dependent clustering of telomerase at elongating telomeres, *Mol. Cell* 44 (2011) 819–827.
- [79] A.D. Mozdy, T.R. Cech, Low abundance of telomerase in yeast: implications for telomerase haploinsufficiency, *RNA* 12 (2006) 1721–1737.
- [80] A.T. Dandjinou, N. Levesque, S. Larose, J.-F. Lucier, S.A. Elela, R.J. Wellinger, A phylogenetically based secondary structure for the yeast telomerase RNA, *Curr. Biol.* 14 (2004) 1148–1158.
- [81] F. Gallardo, P. Chartrand, Telomerase biogenesis: the long road before getting to the end, *RNA Biol.* 5 (2008) 212–215.
- [82] H. Wu, D. Becker, H. Krebber, Telomerase RNA TLC1 shuttling to the cytoplasm requires mRNA export factors and is important for telomere maintenance, *Cell Rep.* 8 (2014) 1630–1638.
- [83] J.S. Pflingsten, K.J. Goodrich, C. Taabazuing, F. Ouenzar, P. Chartrand, T.R. Cech, Mutually exclusive binding of telomerase RNA and DNA by Ku alters telomerase recruitment model, *Cell* 148 (2012) 922–932.
- [84] F. Ouenzar, M. Lalonde, H. Laprade, G. Morin, F. Gallardo, S. Tremblay-Belzile, et al., Cell cycle-dependent spatial segregation of telomerase from sites of DNA damage, *J. Cell Biol.* 216 (2017) 2355–2371.
- [85] E. Smekalova, P. Baumann, TERRA —A calling card for telomerase, *Mol. Cell* 51 (2013) 703–704.
- [86] M. Americ, J. Lingner, Tel1 kinase and subtelomere-bound Tbf1 mediate preferential elongation of short telomeres by telomerase in yeast, *EMBO Rep.* 8 (2007) 1080–1085.
- [87] L.K. Goudsouzian, C.T. Tuzon, S. Zakian VA, *Cerevisiae* Tel1p and Mre11p are required for normal levels of Est1p and Est2p telomere association, *Mol. Cell* 24 (2006) 603–610.
- [88] D. Shore, A. Bianchi, Telomere length regulation: coupling DNA end processing to feedback regulation of telomerase, *EMBO J.* 28 (2009) 2309–2322.
- [89] E. Pennock, K. Buckley, V. Lundblad, Cdc13 delivers separate complexes to the telomere for end protection and replication, *Cell* 104 (2001) 387–396.
- [90] H. Chen, J. Xue, D. Churikov, E.P. Hass, S. Shi, L.D. Lemon, et al., Structural insights into yeast telomerase recruitment to telomeres, *Cell* 172 (2018) 331–343, e13.

- [91] A.H. Fox, S. Nakagawa, T. Hirose, C.S. Bond, Paraspeckles: where long noncoding RNA meets phase separation, *Trends Biochem. Sci.* 43 (2018) 124–135.
- [92] I.A. Sawyer, J. Bartek, M. Dundr, Phase separated microenvironments inside the cell nucleus are linked to disease and regulate epigenetic state, transcription and RNA processing, *Semin. Cell Dev. Biol.* 90 (2019) 94–103.
- [93] K. Förstemann, J. Lingner, Molecular basis for telomere repeat divergence in budding yeast, *Mol. Cell Biol.* 21 (2001) 7277–7286.
- [94] M. Chang, M. Americ, J. Lingner, Telomerase repeat addition processivity is increased at critically short telomeres in a Tel1-dependent manner in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genes Dev.* 21 (2007) 2485–2494.
- [95] M.T. Teixeira, M. Americ, P. Sperisen, J. Lingner, Telomere length homeostasis is achieved via a switch between telomerase- extendible and -nonextendible states, *Cell* 117 (2004) 323–335.
- [96] B. Lemieux, N. Laterreur, A. Perederina, J.-F. Noël, M.-L. Dubois, S. Krasilnikov Andrey, et al., Active yeast telomerase shares subunits with ribonucleoproteins RNase P and RNase MRP, *Cell* 165 (2016) 1171–1181.
- [97] K.-W. Lin, K.R. McDonald, A.J. Guise, A. Chan, I.M. Cristea, V.A. Zakian, Proteomics of yeast telomerase identified Cdc48-Npl4-Ufd1 and Ufd4 as regulators of Est1 and telomere length, *Nat. Commun.* 6 (2015) 8290.
- [98] A. Bah, C.M. Azzalin, The telomeric transcriptome: from fission yeast to mammals, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44 (2012) 1055–1059.
- [99] J. Greenwood, J.P. Cooper, Non-coding telomeric and subtelomeric transcripts are differentially regulated by telomeric and heterochromatin assembly factors in fission yeast, *Nucleic Acids Res.* 40 (2012) 2956–2963.
- [100] C.M. Azzalin, J. Lingner, Telomeres: the silence is broken, *Cell Cycle* 7 (2008) 1161–1165.
- [101] C.H. Haering, T.M. Nakamura, P. Baumann, T.R. Cech, Analysis of telomerase catalytic subunit mutants in vivo and in vitro in *Schizosaccharomyces pombe*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* vol. 97 (2000) 6367–6372.
- [102] S. Coulon, V. Géli, TERRA Incognita at chromosome ends, *EMBO Rep.* 17 (2016) 933–934.